

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**Interacciones entre IGF-I y apoE:
Implicaciones en la Enfermedad de Alzheimer**

TESIS DOCTORAL

Raquel Herrero Labrador

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO CAJAL



Interacciones entre IGF-I y apoE:

Implicaciones en la Enfermedad de Alzheimer

Memoria presentada por Raquel Herrero Labrador para optar al título de Doctor, a partir del trabajo realizado bajo la dirección del Prof. Ignacio Torres Alemán en el Instituto Cajal (CSIC).

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada disfrutando de una ayuda para la formación de doctores (BES-2014-070574) asociada al proyecto SAF2013-40710-R, y posterior proyecto SAF2016-76462-C2-1-P, ambos financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad, y con el Profesor de Investigación Ignacio Torres Alemán como investigador principal de los mencionados proyectos.

Todos los procedimientos con animales de experimentación realizados durante el desarrollo de la Tesis Doctoral cumplen con las normas Europeas de Bienestar Animal (2003/65/CE y 2010/63/UE) y han sido previamente aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Comunidad de Madrid según el RD 53/2013.

Resumen



El metabolismo de los ácidos grasos y de la glucosa son críticos en la homeostasis energética cerebral y buen funcionamiento celular. Dos de las proteínas implicadas en estos procesos son la apolipoproteína E (apoE), considerada el principal transportador de colesterol en el cerebro, y el factor de crecimiento de tipo insulínico I (IGF-I), implicado en el aporte de glucosa por los astrocitos. Ambos están relacionados con la enfermedad neurodegenerativa de Alzheimer ya que se piensa que se trata de un trastorno metabólico al ser característica la resistencia a insulina en el cerebro, de manera similar a la diabetes tipo II periférica. Por otra parte, el genotipo de apoE representa el principal factor de riesgo genético en el desarrollo de la enfermedad considerándose protectora a la isoforma apoE2 y perjudicial la isoforma apoE4.

ApoE e IGF-I se producen localmente en el cerebro, sin embargo, el principal aporte de IGF-I procede de la periferia, tras cruzar la barrera hematoencefálica mediante mecanismos de transcitos mediada por receptores específicos. Por ello, hemos evaluado las posibles interacciones entre IGF-I y las dos isoformas humanas de apoE: apoE2 y apoE4, en varios procesos celulares. En primer lugar, encontramos que apoE, de manera isoforma dependiente, modula la internalización de IGF-I por células endoteliales, pero no en células epiteliales del plexo coroideo. Así, la dieta con alto contenido en grasa, que incrementa los niveles periféricos de apoE, altera la señalización por IGF-I hipocampal en ratones. También observamos que apoE4 atenúa la señalización intracelular por IGF-I, pero no ejerce efecto alguno sobre la acción protectora del IGF-I en las células cerebrales. De la misma forma, demostramos que el IGF-I y la apoE de manera dependiente de isoforma, modulan la cantidad de β -amiloide al modificar su producción en astrocitos, internalización celular y el aclaramiento del plasma. Por último, observamos que el IGF-I estimula la secreción de apoE por astrocitos. Por tanto, concluimos que ambas proteínas interactúan en el cerebro a diferentes niveles, y esta conexión puede ser importante en el desarrollo de resistencia a IGF-I en el cerebro y el genotipo de apoE en la patología de la enfermedad de Alzheimer.

The metabolism of fatty acids and glucose are critical for cerebral energy homeostasis and maintenance of cellular functions. Two proteins involved in these processes are apolipoprotein E (apoE) which is the primary transporter of cholesterol in the brain, and insulin-like growth factor-I (IGF-I), involved in glucose handling by astrocytes. Both are related with the neurodegenerative Alzheimer's disease (AD). The latter is considered a metabolic disorder because brain insulin resistance is a characteristic in AD, as in peripheral type II diabetes. Additionally, the apoE genotype account for the main genetic risk factor for developing the disease where the isoform apoE2 is protective and the apoE4 is detrimental.

ApoE and IGF-I are locally produced in the brain, although the principal source of cerebral IGF-I is from the periphery, crossing the blood brain barrier by a receptor-specific transcytosis mechanism. Thus, we assessed possible interactions between IGF-I and two of the human apoE isoforms: apoE2 and apoE4, at several cellular processes. Firstly, we found that apoE modulates IGF-I uptake by brain endothelial cells, but not in choroid plexus epithelial cells, in an isoform specific manner. Accordingly, high fat diet, that is associated to increased circulating ApoE, impaired hippocampal IGF-I signaling in mice. We also observed that apoE4 mitigates intracellular IGF-I signaling, but it does not have any effect on the protective action of IGF-I on brain cells. In the same way, we revealed that IGF-I and apoE in an isoform-dependent way, modulate amyloid- β burden by modifying its production in astrocytes, cellular uptake and clearance from the plasma. Finally, we observed that IGF-I stimulates apoE release by astrocytes. We conclude that both proteins interact at different cellular levels within the brain and this fact may be an important link between cerebral IGF-I resistance and apoE genotype in the pathology of Alzheimer's disease.

Lista de abreviaturas, tablas y figuras



LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinasa B.	IGF-I	Factor de crecimiento de tipo insulínico-I
Apo	Apolipoproteína	IGF-IR	Receptor de IGF-I
ApoER2	Receptor 2 de apoE ó LRP8	IRS	Proteína adaptadora del receptor de insulina
APP	Proteína precursora de amiloide	ISF	Líquido intersticial
sAPP	Fragmento de APP soluble generado por acción de secretasas	LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
Aβ	péptido β -amiloide	LRP1	Receptor relacionado con LDLR
BACE	enzima β -secretasa	MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
BBB	Barrera hematoencefálica	NMDA	Receptor N-metil-D-Aspartato
CSF	Líquido cefalorraquídeo	PKC	Proteína quinasa C
DM	Diabetes Mellitus	RBEC	Células endoteliales de cerebro de rata
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina	SHC	Proteína adaptadora que contiene dominio de homología Src
EA	Enfermedad de Alzheimer	SNC	Sistema Nervioso Central
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3	VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	VLDLR	Receptor de lipoproteínas de muy baja densidad
HSPG	Proteoglicanos de heparán sulfato		
IDE	Enzima de degradación de insulina		
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia		
IGFBP	Proteínas de unión a IGF-I		

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Introducción

Tabla 1. Isoformas de apoE en la población humana.

Figura 1. Estructura de apoE.

Figura 2. Familia de receptores de LDL.

Figura 3. Vías de señalización por IGF-I.

Figura 4. Vías de procesamiento del APP.

Figura 5. Esquema de los principales mecanismos de eliminación del péptido A β .

Material y Métodos

Tabla 2. Listado de Medios de cultivo empleados para los diferentes tipos celulares.

Tabla 3. Listado de reactivos empleados para el cultivo de los diferentes tipos celulares.

Tabla 4. Listado de anticuerpos empleados para Western blot.

Tabla 5. Listado anticuerpos empleados para Inmunohistoquímica.

Figura 6. Microfotografía de monocapa de células endoteliales.

Figura 7. Esquema del sistema de cultivo con insertos Millicell®.

Figura 8. Microfotografía de monocapa de células epiteliales de plexo coroideo.

Figura 9. Microfotografía de hepatocitos de ratón.

Figura 10. Fotografía del ensayo de viabilidad celular.

Figura 11. Esquema de las etapas de la técnica de PLA.

Figura 12. Esquema de la generación del ratón transgénico FIRKO-T.

Figura 13. Esquema del cronograma seguido en la experimentación con los animales sometidos a dieta con alto contenido en grasa.

Figura 14. Fotografía de una cubeta de enriquecimiento ambiental.

Resultados

Figura 15. ApoE modula la internalización de IGF-I por células de endotelio.

Figura 16. ApoE modula, de manera isoforma-dependiente, el efecto de A β 40 sobre la internalización de IGF-I en células de endotelio, pero no en las de plexo.

Figura 17. ApoE no modifica el transporte de IGF-I por células endoteliales *in vitro*.

Figura 18. Los ratones sometidos a una dieta rica en grasa desarrollan sobrepeso, intolerancia a la glucosa y presentan elevados niveles plasmáticos de IGF-I y apoE.

Figura 19. La dieta con alto contenido en grasa impide la fosforilación del IGF-IR hipocampal tras la estimulación con enriquecimiento ambiental.

Figura 20. Efecto de IGF-I y apoE sobre la interacción entre IGF-IR y LRP1.

Figura 21. Viabilidad celular inducida por IGF-I y su modulación por apoE2 y apoE4, durante 24 y 48 horas.

Figura 22. Efecto de apoE2 y apoE4 sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-I.

Figura 23. Efecto de apoE2 y apoE4 sobre la fosforilación de AKT inducida por IGF-I.

Figura 24. IGF-I induce la liberación de apoE por astrocitos.

Figura 25. Interacción proteica entre el IGF-IR y APP.

Figura 26. ApoE estimula de manera isoforma-dependiente la producción de sAPP en astrocitos, cuyo efecto es modulado por IGF-I.

Figura 27. IGF-I y apoE no modifican la expresión génica de APP en neuronas y astrocitos en cultivo.

Figura 28. Microfotografías de inmunohistoquímica de APP y NeuN en tejido isquémico de ratones FIRKO-T.

Figura 29. Microfotografías de inmunohistoquímica de apoE, NeuN y GFAP en tejido isquémico de ratones FIRKO-T.

Figura 30. El IGF-I favorece la Internalización de A β 40 soluble por astrocitos y hepatocitos y apoE modula su efecto dependiente de isoforma, mientras que se inhibe en microglía y el transporte por transcitosis no se ve modificado.

Figura 31. Microfotografías de astrocitos con A β 40-HiLyte Fluor™ 488 soluble internalizado.

Figura 32. Microfotografías de microglía con A β 40-HiLyte Fluor™ 488 soluble internalizado.

Figura 33. Microfotografías de hepatocitos con A β 40-HiLyte Fluor™ 488 soluble internalizado.

Figura 34. Los animales con sobrepeso presentan mayor aclaramiento de A β 40 por el hígado.

Discusión

Figura 35. Modelo sobre las interacciones entre IGF-I y apoE2.

Figura 36. Modelo sobre las interacciones entre IGF-I y apoE4.

Anexos

Figura 37. ApoE disminuye la internalización de IGF-I por células de endotelio dependiente de isoforma.

Figura 38. Fotografía de rodajas de cerebro de ratón tras isquemia hemorrágica teñido con TTC.

Índice



RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	V
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE).	1
1.1.1.Receptores de apoE en el Sistema Nervioso Central.	4
1.1.2.Funciones de apoE en el Sistema Nervioso Central.	6
1.2. FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULÍNICO (IGF-I).	7
1.2.1.Receptor de IGF-I y vías de señalización intracelulares.	8
1.2.2.Funciones de IGF-I en el Sistema Nervioso Central.	11
1.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA).	12
1.3.1.Producción del péptido β -Amiloide ($A\beta$).	14
1.3.2.Mecanismos de eliminación de $A\beta$.	17
1.3.3.ApoE y Enfermedad de Alzheimer.	18
1.3.4.IGF-I y Enfermedad de Alzheimer.	21
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1. CULTIVOS CELULARES.	31
3.1.1. Reactivos y medios.	31
3.1.2. Cultivo primario de células endoteliales de cerebro de rata (RBEC).	32
3.1.3. Cultivo primario de células epiteliales del plexo coroideo de rata.	33
3.1.4. Cultivo primario de células gliales de corteza cerebral de rata.	34
3.1.5. Cultivo primario de neuronas de corteza cerebral de rata.	35
3.1.6. Cultivo primario de hepatocitos de ratón.	35
3.2. TRATAMIENTOS CELULARES.	36
3.2.1. Lipidación de isoformas de apoE humana.	36
3.2.2. Ensayos de internalización de IGF-I humano.	37
3.2.3. Estudio de las vías de señalización intracelulares de IGF-I.	37
3.2.4. Estimulación de astrocitos con IGF-I.	37
3.2.5. Análisis del procesamiento del APP.	38
3.2.6. Ensayos de internalización de $A\beta_{40}$.	38

3.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA.	39
3.3.1. Ensayo de viabilidad celular.	39
3.3.2. Western Blot.	39
3.3.3. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).	41
3.3.4. Inmunoprecipitación de proteínas.	41
3.3.5. Ensayo de ligación por proximidad (PLA).	42
3.3.6. Inmunohistoquímica.	43
3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	44
3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.	44
3.5. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	45
3.5.1. Modelo de isquemia cerebral hemorrágica.	45
A. Tinción histológica de la región lesionada.	47
3.5.2. Modelo de dieta con alto contenido en grasa.	47
A. Test metabólico de tolerancia a glucosa.	48
B. Enriquecimiento ambiental.	48
C. Aclaramiento periférico de A β 40.	49
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	50
4. RESULTADOS	53
4.1. EFECTO DE APOE Y AB40 SOBRE LA ENTRADA DE IGF-I A TRAVÉS DE CÉLULAS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA <i>IN VITRO</i>	53
4.1.1. Efecto de las isoformas humanas de apoE sobre la internalización de IGF-I por células endoteliales y de plexo coroideo <i>in vitro</i>	53
4.1.2. Efecto de las isoformas humanas de apoE sobre la modulación por A β de la internalización de IGF-I por células endoteliales y de plexo coroideo <i>in vitro</i>	54
4.1.3. Efecto de las isoformas humanas de apoE sobre la transcitosis de IGF-I por células endoteliales <i>in vitro</i>	56
4.2. EFECTO DE APOE SOBRE LA ENTRADA DE IGF-I AL CEREBRO EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE RATÓN.	57
4.2.1. Alteraciones metabólicas desarrolladas por los ratones sometidos a dieta con alto contenido en grasa.	58
4.2.2. Efecto de la dieta con alto contenido en grasa sobre la entrada de IGF-I al cerebro tras enriquecimiento ambiental.	59

4.3. MODULACIÓN POR IGF-I Y APOE SOBRE LA INTERACCIÓN ENTRE IGF-IR Y LRP1.	61
4.4. EFECTO DE APOE E IGF-I SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.	62
4.5. EFECTO DE APOE EN LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE IGF-I <i>IN VITRO</i>	64
4.6. EFECTO DE IGF-I SOBRE LA EXPRESIÓN DE APOE POR ASTROCITOS <i>IN VITRO</i>	66
4.7. EFECTO DE IGF-I y APOE SOBRE EL METABOLISMO DE A β	68
4.7.1. Interacción proteica entre IGF-IR y APP.	68
4.7.2. Efecto de IGF-I y apoE en el procesamiento de APP <i>in vitro</i>	69
4.7.3. Efecto de IGF-I y apoE en la expresión de APP <i>in vitro</i>	71
4.7.4. Implicación del IGF-IR en la expresión de APP y ApoE en un modelo de Isquemia hemorrágica.	72
4.7.5. Efecto de IGF-I y apoE en la internalización de A β 40 <i>in vitro</i>	75
4.7.6. Efecto de IGF-I y apoE en el aclaramiento periférico de A β 40.	78
5. DISCUSIÓN	83
5.1. APOE MODULA LA ENTRADA DE IGF-I AL CEREBRO Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	85
5.2. LA MODULACIÓN POR IGF-I SOBRE EL METABOLISMO DE A β DEPENDE DEL CONTEXTO DE APOE.	91
5.3. IGF-I ESTIMULA LA LIBERACIÓN DE APOE POR ASTROCITOS.	99
5.4. PERSPECTIVAS FUTURAS	106
CONCLUSIONES	113
REFERENCIAS	117
ANEXOS	151
APÉNDICE	155

1

Introducción



1.1. APOLIPOPROTEÍNA E

La apoE es una glicoproteína que se descubrió en los años 70 (Shore and Shore, 1973), presenta 299 aminoácidos con regiones altamente conservadas entre las diferentes especies (Frieden, 2015). En humanos, a diferencia de otros mamíferos, existen tres isoformas de la proteína generadas por el polimorfismo del gen de apoE en el cromosoma 19, con tres alelos denominados $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, que dan lugar a las isoformas apoE2, apoE3 y apoE4, respectivamente (Utermann et al., 1980; Zannis and Breslow, 1980). El alelo $\epsilon 3$ en homocigosis es el genotipo prevalente en la población, por lo que se considera a apoE3 la isoforma nativa. La diferencia entre las tres isoformas reside en dos cambios de aminoácidos, apoE3 presenta una Cys en la posición 112 que es sustituida por una Arg en la isoforma apoE4, y otra Arg en la posición 158 sustituida por una Cys en la isoforma apoE2 (Weisgraber et al., 1981) (Tabla 1). El cambio de esos dos residuos confiere diferencias estructurales importantes entre las tres isoformas a nivel de carga eléctrica, capacidad de unión a lípidos y afinidad por los receptores. Además, existen diferencias entre las tres isoformas por el estado de glicosilación que se produce a nivel post-traducciona l en la Thr194 que es sializada de forma variable (Hawkes et al., 2015; Kockx et al., 2018; Xu et al., 1999).

ISOFORMAS DE APOE EN LA POBLACIÓN HUMANA			
Isoforma	Aminoácido 112	Aminoácido 158	Frecuencia en la población caucásica
ApoE2	Cys	Cys	7%
ApoE3	Cys	Arg	78%
ApoE4	Arg	Arg	15%

Tabla 1. Isoformas de apoE en la población humana.

Se muestra las diferencias entre las isoformas humanas de apoE, así como su distribución en la población humana. Se ha resaltado a apoE3, considerada la isoforma nativa. Modificado de Bales et al., 2002.

La apoE presenta dos dominios estructurales unidos por una región bisagra de 20-30 aminoácidos que los conecta (Mahley et al., 2009). La región amino-terminal (N-terminal) (residuos 1 a 191) se aisló y caracterizó por Wilson y colaboradores en 1991 (Wilson et al., 1991). Es un complejo de cuatro hélices- α antiparalelas (Fig.1) donde los residuos de aminoácidos básicos (Lys, Arg, His) en la hélice 4 (región 142-160) y la Arg172, son críticos para

la interacción de apoE con la región de unión a ligando en los receptores y es una región conservada (Frieden, 2015; Zaiou et al., 2000). La Arg158 forma un puente salino con Asp154, que no se produce en apoE2 por la sustitución que tiene lugar de Arg por Cys por lo que, en esta isoforma, Asp154 interacciona con la Arg150. Esto provoca un cambio en la conformación del dominio y confiere a apoE2 menor afinidad por los receptores (Dong et al., 1996). Por ello, está asociada con la patología de hiperlipoproteinemia de tipo III, en la cual se produce una acumulación de colesterol plasmático debido a un descenso de su aclaramiento mediado por receptores (Getz and Reardon, 2009). Sin embargo, el fenotipo E2/E2 es el menos frecuente en la población (Tabla 1).

Así mismo, se ha propuesto que el cambio a Arg112 en ApoE4, hace que interaccione con el Glu109 que conlleva un cambio de orientación de Arg61 (específica de apoE humano, sustituida por Thr61 en otras especies), que a su vez puede interaccionar con otros residuos, incluidos los del C-terminal (Glu255), generándose un cambio en la conformación de la proteína (Frieden, 2015; Weisgraber, 1990), traducido en mayor susceptibilidad a la degradación proteolítica (Chou et al., 2006; Ramaswamy, 2005) y preferencia por algunos tipos de receptores (Weisgraber, 1994) (Apartado 1.1.1). Por su parte, la presencia de la Cys112 en apoE2 y apoE3 facilita su oligomerización por la formación de puentes disulfuro (LaDu et al., 1995), confiriéndoles más estabilidad frente a apoE4 (Minami et al., 2010).

El dominio carboxilo-terminal (C-terminal; residuos 216-299), cuya estructura pudo conocerse gracias a los estudios de Chen y colaboradores en 2011 (Chen et al., 2011), difiere a la inicialmente propuesta en 2006 (Hatters et al., 2006), y es una hélice- α implicada en la unión a lípidos, concretamente la región comprendida entre los aminoácidos 244-272. También contiene los residuos responsables de las interacciones proteína-proteína (regiones 230-243 y 262-270) (Frieden, 2015; Weisgraber, 1994).

La región C-terminal de apoE es idéntica entre las diferentes isoformas y también cumple funciones importantes en la afinidad por los receptores, ya que interacciona con la hélice 4 (aminoácidos 155-163) del N-terminal (Frieden, 2015). Se ha propuesto que la unión de apoE a lipoproteínas hace que se produzca un cambio conformacional, separándose las 4 hélices del dominio N-terminal, y adquiriendo una conformación más abierta en forma de herradura (Fig.1), que permite que se exponga la región de unión a los receptores. De tal manera que, en bajo estado de lipidación, la apoE tendría una conformación completamente diferente con poca afinidad por los receptores de lipoproteínas (Innerarity et al., 1986; Peters-Libeu et al., 2006; Weisgraber, 1994; Zaiou et al., 2000). Esto hace que las diferencias estructurales adquiridas, como consecuencia de los cambios de aminoácidos que se producen entre apoE2,

apoE3 y apoE4, tengan efectos directos en la afinidad de cada isoforma por lípidos y por receptores, como más adelante se detalla.

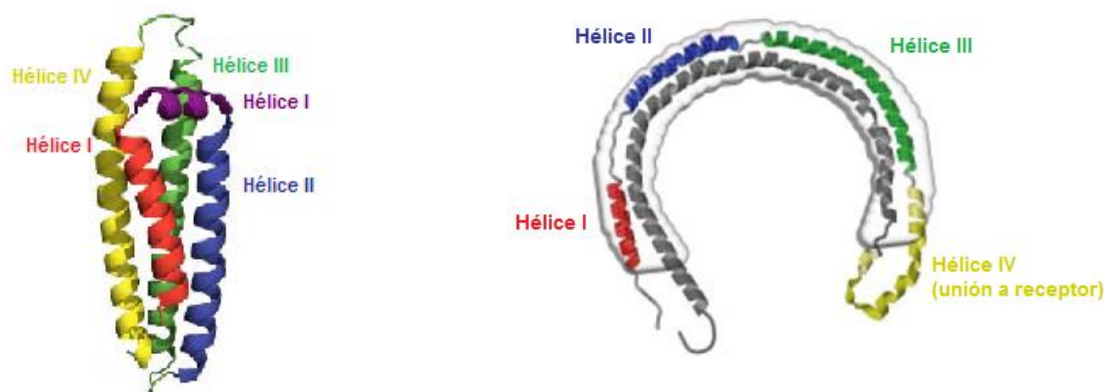


Figura 1. Estructura de apoE.

Modelo de la estructura tridimensional del dominio N-terminal con las hélices antiparalelas I-IV (rojo, azul, verde y amarillo, respectivamente) (**Izquierda**) y conformación que se ha propuesto que adquiere tras su unión a fosfolípidos por el dominio C-terminal (gris) (**Derecha**). Modificado de Hauser et al., 2011 y Peters-Libeu et al., 2006.

La mayoría de los órganos y diferentes tipos celulares sintetizan apoE, aunque la mayor producción se localiza principalmente en el hígado, junto con macrófagos, adipocitos y cerebro (Getz and Reardon, 2009). Por su parte, las enzimas responsables de la degradación proteolítica de apoE son del tipo cisteín-proteasas, aspartil-proteasas, proteasas semejantes a quimotripsina y la serín-peptidasa A1 con alto requerimiento de temperatura (HtrA1) (Chu et al., 2016; Tamboli et al., 2014).

La concentración plasmática de apoE es de aproximadamente 50 µg/ml. Inicialmente, las células liberan apoE sin lipídico pero siempre se encuentra unida a lípidos, por lo que tiene una alta afinidad, mediante la intervención de los transportadores ABCA1 y ABCG1 (del inglés, *Adenosine triphosphate-Binding Cassette transporter*) (Krimbou et al., 2004). La apoE se asocia sobre todo con fosfolípidos, formando discos helicoidales que se combinan con diferentes tipos de lipoproteínas, principalmente de muy baja densidad (VLDL, del inglés *very low density lipoproteins*), aunque también se encuentra en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, del inglés *intermediate density lipoproteins*), lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *High density lipoproteins*) y remanentes de quilomicrones. Parece que el tipo de lipoproteínas plasmáticas con las que se asocia depende de la isoforma, apoE4 tiene mayor preferencia por VLDL enriquecidas en triglicéridos, mientras que apoE2 y apoE3 por pequeñas HDL enriquecidas en fosfolípidos (Dong et al., 1996; Weisgraber, 1990). Así, su principal función es

participar en la regulación de los niveles de lipoproteínas plasmáticas mediante su transporte hasta los diferentes tejidos por su unión a receptores específicos de la superficie celular, y mantener así la homeostasis del metabolismo lipídico intracelular (Mahley, 1988).

Sin embargo, la apoE no cruza la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *Blood Brain Barrier*) (Liu et al., 2012) por lo que es sintetizada localmente en el cerebro, siendo el segundo órgano productor de apoE en cuanto a cantidad. En condiciones fisiológicas, los astrocitos son las principales células responsables de la producción de apoE, aunque también es sintetizada por microglía, pericitos, plexo coroideo y parece que algunas poblaciones neuronales son capaces de sintetizar apoE bajo determinadas condiciones de excitotoxicidad por daño cerebral (Pitas et al., 1987; Xu et al., 2006). A diferencia de la apoE plasmática, la producida por la glía se encuentra solo como componente de las lipoproteínas semejantes en tamaño a las HDL de forma discoidal (DeMattos et al., 2001). En el líquido cefalorraquídeo (CSF, del inglés *Cerebrospinal Fluid*), se encuentra a una concentración de 5 µg/ml formando partículas esféricas similares a las secretadas por la glía, pero además con un núcleo de ésteres de colesterol (LaDu et al., 2002). Constituye la lipoproteína más abundante en este compartimento, por lo que se piensa que, en ausencia de LDL y apoB en el cerebro, que en plasma son las principales lipoproteínas implicadas en el transporte de colesterol, la apoE asume su función en el CSF (Mahley, 1988). Existen otras lipoproteínas en el sistema nervioso central (SNC) entre las que destacan, apoJ conocida como Clusterina que también está sintetizada localmente, y apoAI que procede de la periferia. Los niveles de apoE tanto en plasma como en el CSF y el líquido intersticial (ISF, del inglés *interstitial fluid*) dependen del genotipo de apoE. Los individuos $\epsilon 2/\epsilon 2$ son los que presentan niveles de apoE más altos y los individuos $\epsilon 4/\epsilon 4$ los más bajos (Rasmussen et al., 2015; Riddell et al., 2008; Ulrich et al., 2013), y en general con el envejecimiento sus niveles decaen, mientras que los de apoJ se incrementan (Elliott et al., 2010).

Se han atribuido a apoE funciones importantes en la fisiología cerebral, como se describe más adelante (Apartado 1.1.2).

1.1.1. Receptores de apoE en el Sistema Nervioso Central

La familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR, del inglés, *low-density lipoprotein receptor*) (Fig. 2) incluye al propio LDLR, el LRP1 (del inglés, *LDLR-Related Protein 1*), VLDLR (del inglés, *VLDL Receptor*) y apoER2 (del inglés, *apoE Receptor 2*) también conocido como LRP8. Todos ellos, son los principales receptores de apoE, pero presentan diferentes afinidades dependiendo de la isoforma de apoE y su estado de lipidación. Así, LRP1 une apoE

recombinante o lipoproteínas enriquecidas en apoE como las HDL del CSF preferentemente, mientras que LDLR une con mayor afinidad apoE inicialmente secretada por los astrocitos, y VLDLR puede unir apoE sin lipidar (Narita et al., 2002; Ruiz et al., 2005). En cuanto a isoformas, la apoE2 tiene muy poca afinidad por LDLR por lo que se relaciona con la hiperlipoproteinemia tipo III, y también menos por LRP1 en comparación con las otras dos isoformas de apoE, mientras que la unión es similar a VLDLR por el que apoE4 tiene mayor afinidad (Fagan et al., 1996; Narita et al., 2002; Ruiz et al., 2005). También hay otros miembros de la familia de LDLR que, con menor afinidad, pueden unir apoE como LRP4, LRP5, LRP6, Megalina (LRP2) y SorLA (LRP11). Además, tanto en su estado lipidado como sin lipidar, la apoE se puede asociar con proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG, del inglés *Heparan Sulfate Proteoglycans*) localizados en la superficie celular, también con afinidades diferentes según la isoforma (Ji et al., 1998). Se ha propuesto que los HSPG tienen una función cooperativa con los receptores de apoE en la superficie celular, porque al interactuar con apoE, la retienen en el entorno de los receptores como el LRP1, favoreciendo su unión. Además, HSPG y LRP1 pueden formar complejos que son internalizados, participando directamente en la internalización de apoE (Ji et al., 1998; Mahley and Ji, 1999).

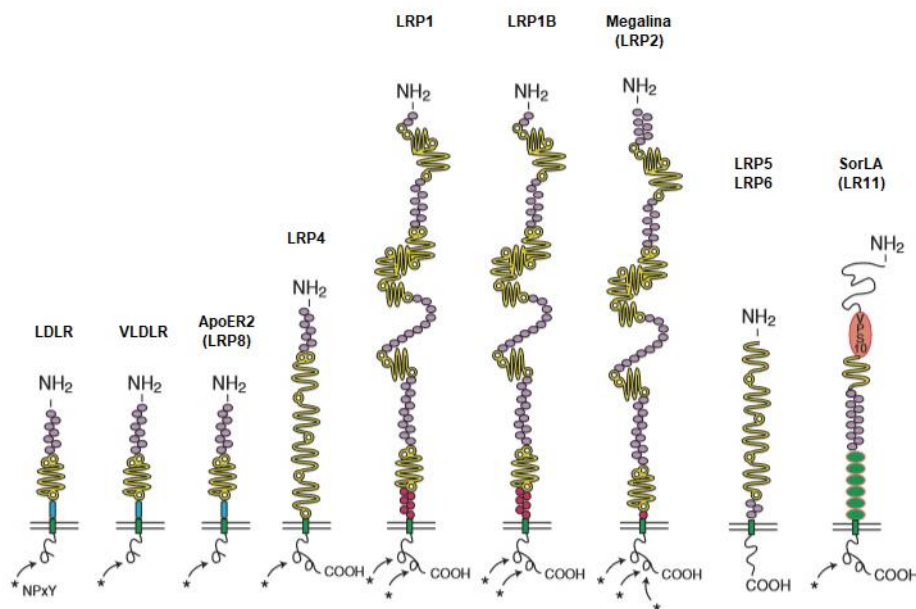


Figura 2. Familia de receptores de LDL.

Modelo de disposición de los principales receptores de la familia LDLR anclados a la membrana plasmática. Se muestra el extremo N-terminal extracelular y el extremo C-terminal intracelular donde se encuentra la región de aminoácidos NPXY por la que se asocian intracelularmente con otras proteínas. Modificado de Holtzman et al., 2012.

Los miembros de la familia de receptores LDL son proteínas transmembrana (Fig. 2) con un dominio citoplasmático muy corto, donde la región altamente conservada de cuatro aminoácidos NPXY actúa como anclaje de numerosas proteínas adaptadoras y de soporte como Dab (del inglés, *Disabled*), implicada en el reclutamiento de las proteínas quinasas Src. (Gotthardt et al., 2000; Trommsdorff et al., 1998). Este dominio también puede asociarse con la proteína PSD95 (del inglés, *Postsynaptic density protein 95*) implicada en la transmisión sináptica ya que hace de soporte de otras proteínas y receptores presentes en la membrana postsináptica como los receptores NMDA (del inglés, *N-Methyl-D-aspartate*) (Gotthardt et al., 2000; Hoe et al., 2006). Por su parte, el dominio amino terminal es extracelular y muy largo, a través del cual también puede interaccionar con co-receptores y otros tipos de proteínas modulando su actividad, como el mencionado receptor NMDA con el que además de intracelularmente, pueden interaccionar extracelularmente (Beffert et al., 2005; Hoe et al., 2006).

Estos receptores son endocíticos y regulan los niveles de apoE en el SNC, sobre todo LRP1 que está muy expresado en neuronas y en menor grado en glía, y LDLR que es más abundante en glía que en neuronas (Rapp et al., 2006; Rebeck et al., 1993). No obstante, a excepción del LDLR, no son receptores exclusivos para apoE ya que pueden unir otros tipos de moléculas. Por ejemplo, apoER2 y VLDLR tienen alta afinidad por Reelina (D'Arcangelo et al., 1999; Hiesberger et al., 1999) y el LRP1, que es uno de los más estudiados, media la internalización celular de varias moléculas ya que posee en el extremo N-terminal hasta cuatro sitios de unión a diferentes ligandos (Candela et al., 2015; Zlokovic et al., 2010).

1.1.2. Funciones de apoE en el Sistema Nervioso Central

Gracias a modelos animales generados en ratón, en los que se ha bloqueado la expresión de apoE y/o expresan las isoformas humanas, se han podido conocer muchas funciones de apoE durante el desarrollo del SNC y en el cerebro maduro, así como la implicación de cada una de las diferentes isoformas humanas.

Los receptores apoER2 y LRP1 tienen un papel importante en el desarrollo del SNC y plasticidad sináptica, tanto a través de la alta afinidad por Reelina del primero, como por la interacción física que establecen ambos con subunidades de los receptores NMDA y la proteína PSD95 o la modulación de los receptores AMPA (del inglés, *Alpha-amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid*) (D'Arcangelo et al., 1999; Gotthardt et al., 2000; Hoe et al., 2006). Por tanto, apoE puede interferir con los mecanismos en los que estas proteínas están implicados, de forma dependiente de isoforma, de tal manera que apoE4 suprime la

plasticidad y transmisión sináptica modificando la expresión de proteínas sinápticas y morfología dendrítica, lo que repercute en los procesos de aprendizaje y memoria, mientras que con apoE3 se mantiene el buen funcionamiento de la transmisión sináptica (Beffert et al., 2005; Chen et al., 2010; Hayashi et al., 2007; Nathan et al., 2002; Weeber et al., 2002).

La función predominante de apoE en el SNC, al igual que en la periferia, es el transporte de lípidos, entre ellos el colesterol necesario para la formación de sinapsis, y su redistribución entre los diferentes tipos celulares tanto en condiciones basales como de daño cerebral. En la condición basal, la glía produce mayor cantidad de colesterol que las neuronas (Mauch et al., 2001; Poirier et al., 1993) pero, tras un daño cerebral, se incrementa la expresión de apoE neuronal que interviene en la neurorreparación y generación de nuevas conexiones nerviosas (Nathan et al., 2002; Xu et al., 1999). De manera tal, que el daño sufrido tras una hemorragia cerebral tiene peor pronóstico si se expresa apoE4, frente a las otras dos isoformas (Alberts et al., 1995). Además, los niveles de apoE en la periferia son cruciales en la arteriosclerosis y la hiperlipoproteinemia, que a su vez también afectan a la vasculatura cerebral, asociándose estas patologías con un mayor riesgo a padecer microhemorragias y lesiones isquémicas (Getz and Reardon, 2009). También se ha visto que la apoE modula la integridad de la BBB de manera isoforma dependiente, siendo apoE4 perjudicial, ya que ratones que expresan esta isoforma presentan desestabilización de las propiedades de barrera (Bell et al., 2012; Nishitsuji et al., 2011). No obstante, a pesar de la implicación de apoE en procesos tan importantes, los cerebros de ratones en los que se ha bloqueado su expresión son aparentemente normales (Anderson et al., 1998).

1.2. FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULÍNICO-I (IGF-I)

El factor de crecimiento de tipo insulínico-I (IGF-I) fue descrito en los años 50 por Salmon y Daughaday (Salmon and Daughaday, 1957) y posteriormente aislado y caracterizado por Rinderknecht y Humbel (Rinderknecht and Humbel, 1978). Pertenece a la superfamilia de la insulina junto a otros miembros como la propia insulina, IGF-II, relaxinas y otras hormonas de tipo insulínico. Su estructura tiene mucha homología con la de insulina, con la que coopera en muchas funciones fisiológicas (Fernandez and Torres-Alemán, 2012). El IGF-I se sintetiza como una pre-proteína que, por procesamiento proteolítico, da lugar a la forma madura de la proteína con 70 aminoácidos y 7,6 KDa. El principal órgano productor es el hígado, en respuesta a la estimulación por la hormona de crecimiento, aunque se expresa en todos los tejidos (D'Ercole et al., 1984; Lowe et al., 1987). A diferencia de la insulina, se transporta asociado a proteínas de unión específicas (IGFBPs, del inglés *Insulin like Growth Factor Binding Proteins*) que regulan su bio-disponibilidad, de las que se han descrito hasta seis tipos y por las

que tiene una alta afinidad (Firth and Baxter, 2002). Se ha propuesto que IGFBP-2 y 3 podrían potenciar la actividad de IGF-I mientras que IGFBP-4 y 5 estarían actuando como inhibitorias (Walter et al., 1997), pero es necesario que IGF-I se separe de las IGFBPs para que interaccione con los receptores.

El IGF-I es un factor neurotrófico y en el cerebro se puede producir localmente por todos los tipos celulares. Esta producción en el cerebro adulto está muy disminuida en condiciones fisiológicas respecto a etapas del desarrollo, por lo que el principal aporte de IGF-I en el SNC proviene de la periferia mediante el transporte dependiente de receptor por las células que componen la BBB (Fernandez and Torres-Alemán, 2012; Lackey et al., 2000). Las células del plexo coroideo y las células endoteliales de los vasos sanguíneos expresan una gran cantidad de receptores de IGF-I (IGF-IR, del inglés *IGF-I Receptor*), lo que permite su transcitosi al interior del cerebro (Fernandez and Torres-Alemán, 2012). Esta entrada del IGF-I periférico al cerebro, se puede ver fomentada por muchos factores, como el ejercicio físico (Carro et al., 2000; Trejo et al., 2008), el enriquecimiento ambiental (Baldini et al., 2013) y la propia demanda del cerebro, proponiéndose que la actividad neuronal inicia una cascada de señalización que concluye con un aumento de la entrada de IGF-I circulante, a lo que se ha llamado “acoplamiento neurotrófico” (Nishijima et al., 2010). Además, otros receptores endocíticos como LRP1 o megalina (LRP2), también muy expresados en células de la BBB, cooperan en el transporte de IGF-I al interior del cerebro (Carro, 2005; Nishijima et al., 2010). Se ha observado que, tras una lesión cerebral, se incrementan los niveles de IGF-I como respuesta homeostática, principalmente aumenta la entrada de IGF-I periférico pero también se ve incrementada la expresión local de IGF-I por microglía, astrocitos y neuronas (Santi et al., 2018).

1.2.1. Receptor de IGF-I y vías de señalización intracelulares

El IGF-IR, al igual que el receptor de insulina, se encuentra altamente expresado en el SNC durante el desarrollo, pero sus niveles descienden posteriormente en el cerebro maduro, y el nivel de expresión varía dependiendo del tipo celular y localización (Bondy et al., 1992). El IGF-I y la insulina, a concentraciones bajas (0,1-10 nM), se unen a sus receptores específicos, sin embargo, a concentraciones elevadas, de entre 100-500 veces mayores, puede darse también una activación cruzada, ya que tanto la insulina puede unirse al IGF-IR como el IGF-I puede hacerlo al receptor de insulina (Adlerz et al., 2007). Además, ambos receptores pueden formar receptores híbridos funcionales, con afinidad por IGF-I e insulina (Belfiore et al., 2009; Fernandez and Torres-Alemán, 2012).

Estructuralmente, son homotetrámeros con dos subunidades- α extracelulares en el extremo N-terminal y dos subunidades- β intracelulares en el extremo C-terminal (Arnold et al., 2018; Lawrence et al., 2007), excepto en el caso de los receptores híbridos que son heterotetrámeros formados por una subunidad- α y una subunidad- β del IGF-IR y sus homólogos del receptor de insulina.

La región específica de unión al ligando se encuentra en la cadena- α , mientras que las cadenas- β intracelulares presentan dominios de actividad intrínseca Tyr-quinasa y se asocian a proteínas adaptadoras, siendo la familia de proteínas IRSs (del inglés, *Insulin Receptor Substrates*) y SHC las mejores caracterizadas hasta la fecha (Arnold et al., 2018), que a su vez reclutan proteínas con dominios SH2 repetidos (White, 2002).

La activación de receptores de insulina o de IGF-IR induce cascadas de señalización comunes pero, según la activación de cada receptor, los efectos biológicos son distintos (Fernandez and Torres-Alemán, 2012). Cuando el ligando se une a la subunidad- α extracelular, se induce la dimerización de las subunidades- β intracelulares y autofosforilación del receptor en Tyr1131, Tyr1135 y Tyr1136, internalizándose el complejo ligando-receptor e iniciándose las rutas de señalización (Baxter, 2015; Bondy and Cheng, 2004) (Fig. 3). Una vez internalizado, se separa el complejo y se produce la degradación del ligando por peptidasas como catepsinas (Authier et al., 2005; Navab et al., 2008), así como la inactivación del receptor, por fosfatasas específicas como la PTP1B (del inglés, *Protein Tyrosine Phosphatase 1B*), para su reciclaje (Dubé and Tremblay, 2005). La ruta de señalización, iniciada por la internalización del receptor, se transduce por la fosforilación de los sustratos IRSs (IRS1, IRS2) o SHC, que reclutan y activan a las Ser/Thr-quinasas PI3K (del inglés, *phosphatidylinositol 3-Kinase*)-AKT (también conocida como proteína quinasa B), y RAS-RAF-MAPK (del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), respectivamente. Estas dos rutas, constituyen las vías canónicas de señalización por las cuales el IGF-I está mediando sus principales funciones en el control del metabolismo, proliferación y supervivencia celular (Laviola et al., 2007) (Fig. 3). Aunque también se ha encontrado que el IGF-IR sin ligando unido puede estar implicado en la señalización pro-apoptótica por mecanismos independientes de quinasas (Boucher et al., 2010) o en la captura de glucosa por astrocitos (Hernandez-Garzón et al., 2016).

El IGF-IR activo también se puede translocar al núcleo actuando como modulador transcripcional y aunque se desconocen las rutas por las cuales ocurre esto, parece que se requiere la sumoilación del receptor (Aleksic et al., 2010; Sehat et al., 2010).

La actividad del IGF-IR está regulada por retroalimentación y a través de la señalización cruzada con otras rutas. Así, la fosforilación en Ser/Thr de IRS por quinasas de la propia ruta de señalización como la proteína quinasa B (AKT) y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3, del inglés, *Glycogen Synthase Kinase*) y de otras vías como AMPK (el inglés, *Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase*) y PKC (del inglés, *Protein Kinase C*) entre otras, inhibe su función al facilitar su degradación o inhibiendo la interacción entre las proteínas con las que se asocia. Además, el IRS-1 puede acetilarse cerca de los sitios de unión con las proteínas que recluta, perdiendo estabilidad la interacción, por lo que se puede regular independientemente del estado de fosforilación. A su vez, también se puede producir la desfosforilación de quinasas que participan a otros niveles de la ruta, como la inactivación de AKT por la fosfatasa PHLPP (Gao et al., 2005).

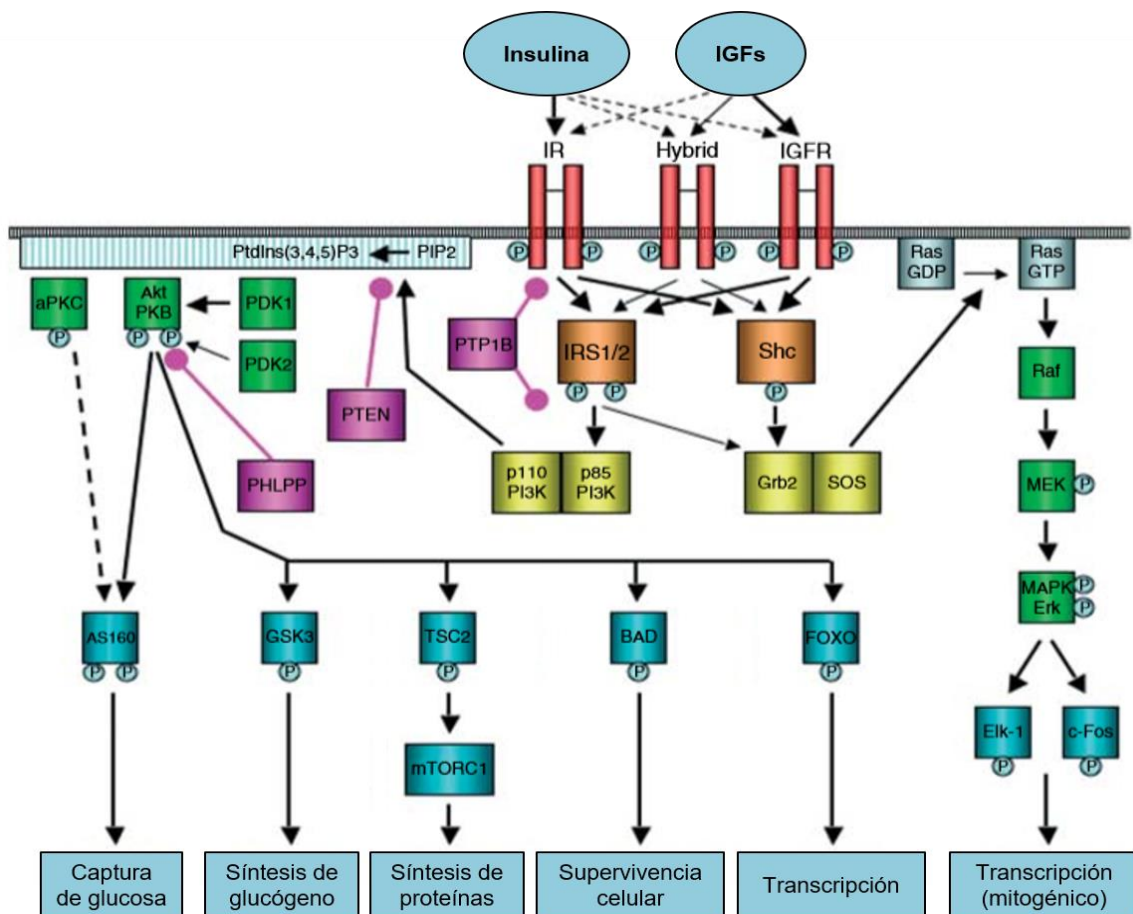


Figura 3. Vías de señalización por IGF-I.

Se muestra el esquema de las rutas canónicas de señalización activadas por IGF-I por unión a su receptor específico y otros receptores, así como por ligandos afines de la superfamilia de la insulina. Modificado de Siddle 2011.

1.2.2. Funciones de IGF-I en el Sistema Nervioso Central

El IGF-I es crítico para el desarrollo del SNC ya que, en modelos con animales transgénicos donde se modifica la expresión de IGF-I, o alguna de las IGFBPs, se han encontrado cambios en el tamaño cerebral, número celular y sinaptogénesis, entre otros (Kappeler et al., 2008; Lee et al., 2011; O'Kusky et al., 2000). Después de las etapas del desarrollo, el IGF-I sigue implicado en la neurogénesis y angiogénesis, procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, así como en la regulación del estado de ánimo con efectos antidepresivos (Burgdorf et al., 2016; Trejo et al., 2008). Por su parte, otros estudios han revelado que actúa como antiinflamatorio bloqueando la acción de citoquinas proinflamatorias (Fernandez et al., 2007) y es un potente neuroprotector, implicado en la supervivencia neuronal a través de la vía PI3K-AKT (Bondy and Cheng, 2004; Torres-aleman, 2003). Así mismo, tiene un papel importante en el mantenimiento de las funciones celulares, ya que es uno de los principales moduladores del equilibrio energético (Fernandez et al., 2018) mediado principalmente a través de la ruta MAPK, iniciada tanto por IRSs como por SHC, frente a la ruta AKT que favorece la supervivencia celular por inhibición de la maquinaria pro-apoptótica (van der Heide et al., 2006) y que sólo es iniciada por IRSs (Fig. 3). IRS y SHC pueden competir en su unión al IGF-IR, y según el tipo celular, es predominante un sustrato frente al otro, lo que hace que el IGF-I pueda comportarse en mayor medida como regulador metabólico o como mitógeno, dependiendo del contexto celular (Siddle, 2011).

Durante el envejecimiento decaen mucho los niveles de IGF-I plasmáticos y cerebrales (Breese et al., 1991; Muller et al., 2012), y se ha propuesto que con la edad se produce una resistencia del cerebro a IGF-I (Carro and Torres-Aleman, 2004), reflejada, entre otras cosas, en un aumento de los niveles del IGF-IR. Esta resistencia se ha relacionado con el deterioro de las funciones fisiológicas cerebrales y pérdida de memoria asociadas a la edad, que en estudios con ratones, mejora tras la administración de IGF-I (Markowska et al., 1998), aunque existe una fuerte controversia al respecto, como más adelante se detalla. De la misma forma, el desarrollo de patologías como Diabetes Mellitus tipo II (DMII), en la que se produce una resistencia periférica a IGF-I/insulina, implica una mayor predisposición a sufrir enfermedades neurodegenerativas con demencia de tipo Alzheimer (Arnold et al., 2018; Lackey et al., 2000) (Ver apartado 1.3.4).

En otras situaciones patológicas, como las lesiones cerebrales producidas por isquemia, se ha visto que cambios en los niveles de IGF-I cerebrales conlleva diferencias sobre la evolución de la lesión, pero se han obtenido resultados contradictorios entre los diferentes estudios (Endres et al., 2007; Guan et al., 2003). Así, en algunos modelos animales atenuar la

señalización de IGF-I previamente a que se produzca la lesión parece ser beneficioso (Endres et al., 2007) y sin embargo en otros, IGF-I actúa como neuroprotector cuando se administra tras la lesión (Guan et al., 2003). Estas observaciones sugieren que el contexto tisular es importante en las respuestas a IGF-I.

1.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA) debe su nombre a que fue descrita por Alois Alzheimer en 1907 (Alzheimer, 1907; Stelzmann et al., 1995), es el tipo de demencia más común (entre el 60-70% de los casos de demencia) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima su prevalencia en 30 millones de personas, con una tasa de aparición de aproximadamente 6 millones de casos nuevos al año en todo el mundo, aumentando progresivamente su incidencia como consecuencia del aumento de la esperanza de vida y mayor envejecimiento de la población.

A nivel histológico, en el primer caso descrito por A. Alzheimer, se hallaron en el cerebro las marcas patológicas que identifican esta enfermedad, conocidas como “placas seniles” y los “ovillos neurofibrilares” (Stelzmann et al., 1995). Las primeras están compuestas mayoritariamente por depósitos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$, del inglés *Amyloid- β*) que procede de la proteína precursora de amiloide (APP, del inglés *Amyloid Precursor Protein*) tras su procesamiento proteolítico secuencial por la enzima β -secretasa y posteriormente por la γ -secretasa, también conocida como presenilina (PS) (Golde et al., 1992) (Apartado 1.3.1). Por su parte, los “ovillos neurofibrilares” se deben a la acumulación intracelular de la proteína Tau hiperfosforilada (Tracy and Gan, 2018).

La conocida como EA familiar, o de aparición temprana por darse en personas más jóvenes (menores de 65 años) es la forma menos común de la enfermedad (menos del 1% de los casos de EA). Está determinada genéticamente por herencia familiar en la amplia mayoría de los casos (92%-100%) (Schellenberg, 1995; Wingo et al., 2012). Principalmente se han identificado mutaciones en tres genes que codifican para APP, localizado en el cromosoma 21, para PS1 y para PS2 en el cromosoma 14 y 1, respectivamente (Price and Sisodia, 1998; Yoshikai et al., 1990). Entre el 10%-15% se tratan de mutaciones de transmisión autosómica dominante (Campion et al., 1999). Estas mutaciones conllevan la sobreproducción del péptido $A\beta$ y una acelerada fibrilización y depósito de éste. Por ello, entre los individuos que padecen síndrome de Down, caracterizado por una trisomía del cromosoma 21, y por tanto una mayor expresión de APP, hay un alto porcentaje de desarrollo de EA a edades tempranas (Rohn, 2014). Debido a la relación entre la sobreproducción y acumulación de $A\beta$, con el desarrollo de EA, se ha

postulado la “hipótesis de la cascada amiloide”, una de las teorías más conocidas y aceptadas para explicar la fisiopatología de la EA, donde la acumulación aberrante del péptido A β en el cerebro tendría un papel central, siendo la causa primaria que conllevaría una cascada patogénica que conduce a la neurodegeneración con consecuentes síntomas psicológicos y cognitivos (Hardy and Higgins, 1992). Por otro lado, otras teorías más recientes postulan que la acumulación de A β es un evento posterior y no produce el inicio de la patología, pero contribuye a su avance y agravamiento (Pimplikar et al., 2010).

Muchas de las investigaciones se esfuerzan en aportar datos en cuanto a los mecanismos de producción y eliminación del péptido A β en el cerebro, imprescindible para conocer el desarrollo de otra forma mucho más común de la enfermedad, la llamada EA de tipo esporádico, que prevalece en el 99% de los casos de EA. A diferencia de la de tipo familiar, la EA de tipo esporádico aparece en etapas de la vida más tardías (<65 años) y no se conocen las causas exactas que dan lugar a padecer la enfermedad, porque los pacientes no presentan las mutaciones relacionadas con la EA de tipo familiar (Schellenberg, 1995). Se ha propuesto que un desequilibrio entre los mecanismos de producción y/o eliminación de A β conduce a su acumulación y desarrollo de la patología (Mawuenyega et al., 2010; Selkoe, 2001). Se puede llegar al diagnóstico de EA de tipo esporádico, debido al deterioro cognitivo y síntomas neuropsiquiátricos que aparecen en los estadios más avanzados de la enfermedad. Actualmente, también se utilizan biomarcadores (Olsson et al., 2016) tales como la concentración de A β en el CSF, que se encuentra disminuida respecto a individuos sanos, lo que se asocia directamente con su acumulación en el parénquima cerebral (Andreasen et al., 2003; Castellano et al., 2011); o el aumento de Tau y su forma fosforilada en el CSF, que correlaciona con un aumento de los depósitos intracelulares patológicos. Ambos relacionados con los síntomas cognitivos de pacientes con EA (Andreasen et al., 2003). Así mismo, gracias a estudios epidemiológicos, se han establecido factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la enfermedad, entre ellos genéticos como la expresión del alelo apoe4 y no genéticos como el envejecimiento, obesidad y la DMII (Arnold et al., 2018; Talbot et al., 2012) como más adelante se detalla (Apartados 1.3.3 y 1.3.4). Sin embargo, el diagnóstico definitivo se realiza sólo *post-mortem*, hallando en los cerebros de los pacientes las marcas histopatológicas características de la EA descritas inicialmente por A. Alzheimer (Hyman et al., 2012). Este hecho, dificulta poder investigar los mecanismos desde el inicio de la enfermedad y mientras está cursando, por lo que los estudios realizados en diferentes modelos animales, mayoritariamente generados en ratón, ha permitido avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la EA, evidenciándose que se trata de una enfermedad muy compleja, con

mecanismos interrelacionados a distintos niveles (Davis and Laroche, 2003). Sosteniéndose en la hipótesis amiloide, y en el papel central que tendría la acumulación de A β en el desarrollo de EA, muchos de estos modelos animales están basados en generar ratones modificados genéticamente que expresen las mutaciones humanas de los genes implicados en la forma familiar de la EA (APP, PS1 y PS2), consiguiéndose la sobreproducción del péptido A β (McGowan et al., 2006; Price and Sisodia, 1998). Gracias a estos modelos, y junto con estudios *in vitro*, se ha llegado a profundizar en el mecanismo por el cual se produce y se regula a nivel cerebral el metabolismo del A β .

1.3.1. Producción del péptido A β

La familia de las proteínas APP, a la que pertenecen el propio APP y sus parálogos APLP1 y APLP2 (del inglés, *Amyloid Precursor-Like Proteins 1 y 2*) son proteínas de membrana con un único dominio transmembrana, un gran dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal citoplásmico corto. Su expresión está muy elevada en el cerebro y APLP1 sólo se encuentra en este órgano, mientras que APP y APLP2 se expresan también fuera del cerebro ubicuamente (Zheng and Koo, 2011). Todos los miembros de la familia tienen funciones importantes para la supervivencia celular, ya que cuando se bloquea la expresión de alguna de estas proteínas en ratones, se observa una disminución en su peso corporal y cerebral (Zheng et al., 1995) y si no se expresan al menos dos de ellas el animal no es viable (Von Koch et al., 1997).

Se ha propuesto que pueden actuar como receptores de membrana y, tras su procesamiento proteolítico, también como transductores de señales, tanto por la translocación al núcleo del dominio citoplásmico, como por la liberación de fragmentos solubles del extremo N-terminal. Participando en funciones fisiológicas como moduladores de la excitabilidad neuronal, plasticidad sináptica y crecimiento axonal (Korte et al., 2012; Taylor et al., 2008).

Los mecanismos de procesamiento de APP son muy complejos y para todas las proteínas pertenecientes a esta familia ocurren de forma similar, aunque no idéntica, ya que intervienen proteínas diferentes durante la regulación del procesamiento por secretasas de APP, APLP1 o APLP2 (Adlerz et al., 2007), y sólo el procesamiento de APP, puede dar lugar a la producción del péptido β -amiloide (Zheng and Koo, 2011). Por corte y empalme génico se generan diferentes isoformas de APP con diferentes tamaños, y la secuencia de A β se encuentra incluida solo en las de mayor tamaño con 695, 751 y 770 aminoácidos, llamadas APP₆₉₅, APP₇₅₁ y APP₇₇₀, respectivamente. APP₆₉₅ es la isoforma mayoritaria en neuronas, mientras

que en células gliales son más abundantes las otras dos isoformas más grandes que además incluyen un dominio KPI (del inglés, *Kunitz-type Protease Inhibitor*), por el que puede interaccionar con otras proteínas extracelularmente, y que se pierde en la isoforma APP₆₉₅ (Belyaev et al., 2010). Además, todas las isoformas contienen un dominio NPxY de interacción con otras proteínas a nivel intracelular, como la proteína adaptadora FE65 (Pietrzik, 2004; Trommsdorff et al., 1998).

El procesamiento del APP se produce secuencialmente por la intervención de diferentes secretasas (Fig. 4). A nivel extracelular, puede actuar la α -secretasa, cuya actividad se ha asociado a proteínas de la familia ADAM (del inglés, *A Disintegrin And Metalloproteinase*) (Kuhn et al., 2010) generándose la separación de una gran parte de la porción N-terminal extracelular y soluble (sAPP α , del inglés *soluble APP α*), de la porción C-terminal que queda anclada a la membrana (APP-CTF α , del inglés *APP-Carboxyl Terminal Fragments α*) de 83 aminoácidos, por lo que también es referido como C83; o puede actuar la β -secretasa, llamada BACE (del inglés, *β -site APP Cleaving Enzyme*), de la que se han descrito dos formas BACE1 y BACE2 aunque es mayoritaria la primera (Agostinho et al., 2015), con actividad aspartil-proteasa que conlleva la separación de la porción N-terminal soluble (sAPP β), permaneciendo anclado a la membrana un fragmento APP-CTF β algo mayor que en el caso anterior, de 99 aminoácidos (C99) que incluye la secuencia del péptido A β (Vassar et al., 1999). La intervención de α - o β -secretasas parece que depende de la localización celular en la que se encuentre el APP, favoreciéndose la actividad α -secretasa si se encuentra en la membrana plasmática frente a la intervención preferente que tiene β -secretasa en los compartimentos endocíticos (Golde et al., 1992). Se ha descrito que la interacción de APP con otras proteínas en la membrana, como los receptores de lipoproteínas, puede modular su localización y por tanto su procesamiento por una u otra enzima (Fuentealba et al., 2007; Pohlkamp et al., 2017; Ulery et al., 2000). En cualquier caso, tras la primera escisión, los APP-CTFs son diana de las γ -secretasas que son aspartil-proteasas, cuya región catalítica es la presenilina (PS), por lo que también se las reconoce con ese nombre, y que actúan a nivel de la región transmembrana, generándose por un lado la separación del dominio intracelular (AICD, del inglés *APP Intracellular Domain*) de 47 aminoácidos, y por otro, un péptido pequeño de 3 kDa (p3) del APP-CTF α , o el péptido A β del APP-CTF β (Agostinho et al., 2015; Vassar et al., 1999).

El péptido A β puede tener entre 39-43 aminoácidos, aunque las formas predominantes son las de 40 y 42 aminoácidos (A β 40 y A β 42, respectivamente) (Bitan et al., 2002). Es importante destacar que el lugar de corte de α -secretasa se encuentra dentro de la región que compone el A β , por lo que si inicialmente actúa esta enzima no se puede generar este péptido, y por ello

se hace referencia a la “vía no amiloidogénica” de procesamiento del APP, en favor de si actúa la β -secretasa, concretamente BACE1, designada como “vía amiloidogénica” (Agostinho et al., 2015; Golde et al., 1992; Zheng and Koo, 2011). Además, ninguna de estas secretasas son específicas del APP, ya que pueden procesar un gran número de proteínas de membrana, entre ellas los receptores de apoE como por ejemplo el LRP1 (Von Arnim et al., 2005; May et al., 2002).

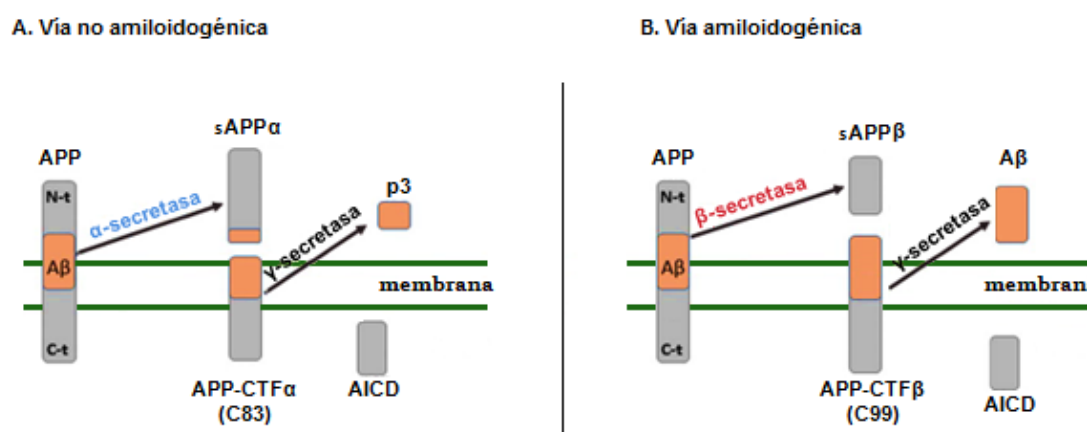


Figura 4. Vías de procesamiento del APP.

Esquema en el que se muestra el procesamiento de APP secuencial por α -secretasas y γ -secretasas por la vía no amiloidogénica (A), o por β -secretasas y γ -secretasas en la vía amiloidogénica (B). Se representa en color naranja el fragmento que corresponde con A β . Modificado de Agostinho et al., 2015.

En el cerebro de los pacientes con EA aparece A β 40 como A β 42, y aunque parece que el nivel de A β 40 correlaciona mejor con la severidad de la enfermedad, se ha atribuido a A β 42 una mayor patogenicidad, porque forma fibras con mayor facilidad, lo que aumenta su insolubilidad y agregación en el parénquima cerebral (Bitan et al., 2002). Algunos estudios *in vitro* han revelado que la fibrilización de A β es un proceso muy complejo con dos etapas: la nucleación, donde los monómeros por cambios conformacionales se agregan formando oligómeros; y la elongación, con una cinética más rápida, donde los monómeros, y oligómeros formados previamente, se van incorporando a las zonas terminales, aumentando su longitud y dando la forma fibrilar (Jarrett et al., 1993; Lomakin et al., 1997). No obstante, también se ha atribuido a los oligómeros y formas solubles de A β una potente acción neurotóxica (Hartley et al., 1999), mientras que las formas monoméricas se han relacionado tanto con un papel fisiológico e incluso neuroprotector (Giuffrida et al., 2009; Zimbone et al., 2018), como con

procesos patológicos, promoviendo la alteración de Tau bajo condiciones concretas con un exceso de monómeros de A β 42 (Manassero et al., 2016; Tamagno et al., 2018).

1.3.2. Mecanismos de eliminación de A β

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre los mecanismos celulares de producción y eliminación de A β en el cerebro. Sin embargo, cuando tiene lugar un exceso de producción, o no son eficientes los mecanismos de eliminación, se elevan los niveles de A β , lo que favorece su agregación y la formación de precipitados extracelulares que dan lugar a las placas seniles, tóxicas para las células del entorno. Por ejemplo, la falta de regulación del aclaramiento de A β conlleva la angiopatía amiloide cerebral, debido a su acumulación en las paredes de vasos sanguíneos (Love, 2004). Apoyándose en la hipótesis de la cascada amiloide, se ha postulado que la acumulación de A β debido a un defecto en su eliminación, más que a su sobreproducción, puede ser uno de los procesos patológicos que tienen lugar durante el desarrollo de la forma esporádica de la EA (Mawuenyega et al., 2010; Selkoe, 2001), por lo que los mecanismos de eliminación de A β están siendo cada vez más investigados.

El A β se puede eliminar del cerebro por varias vías (Fig. 5), una de las principales es la degradación proteolítica por metaloendopeptidasas como la neprelisina, enzima de degradación de insulina (IDE, del inglés *Insulin degrading enzyme*), que actúa extracelularmente, y enzimas convertidoras de endotelina 1 y 2 (ECE 1 y 2, del inglés, *endothelin-converting enzymes*) que actúan intracelularmente, o por metaloproteinasas de matriz (MMP, del inglés *Matrix Metalloproteinase*) implicadas en su degradación extracelular (Farris et al., 2003; Iwata et al., 2001; Leissring, 2008; Selkoe, 2001).

La glía (microglía y astrocitos) cumple un papel fundamental porque sintetiza muchas de estas enzimas, y puede internalizar el A β soluble por pinocitosis o las formas más complejas por fagocitosis. Recientemente también se está proponiendo un papel del sistema glinfático, por el canal acuoso Acuoporina 4, ampliamente expresado en los pies astrocitarios que conectan con las células endoteliales a nivel de la BBB y por donde podrían drenar el A β (Iliff and Nedergaard, 2013; Yang et al., 2012).

Otro mecanismo celular de gran importancia por el que se puede eliminar el A β del parénquima cerebral es su aclaramiento por endocitosis mediada por receptor. Se considera que hay varios tipos de receptores que pueden unir A β directamente o actuar en su aclaramiento de manera indirecta, algunos de ellos expresados en glía como: SR-A y SR-B1 (del inglés, *Scavenger Receptor A y B1*), CD36 y CD40; RAGE (del inglés, *Receptor for Advanced Glycation End Products*); TREM-2 (del inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*)

y TLR (*Toll-Like Receptor*) principalmente expresados por la microglía; y los receptores de lipoproteínas LDLR y LRP1 (Ries and Sastre, 2016). Por influencia de proteínas-ligando de estos receptores, actuando como chaperonas por su unión a A β , se modula la actividad endocítica, y entre ellas destacan: α 1-antiquimotripsina, α 2-macroglobulina, apoJ y apoE (Kang et al., 2000).

En este sentido, ha cobrado un interés especial el receptor LRP1, no solo por su implicación en la internalización de A β por células gliales, sino también porque se encuentra altamente expresado en el lado abluminal de las células endoteliales cerebrales, por podría mediar el transporte de A β a través de la BBB (Bell et al., 2007; Pflanzner et al., 2011; Zlokovic et al., 2010).

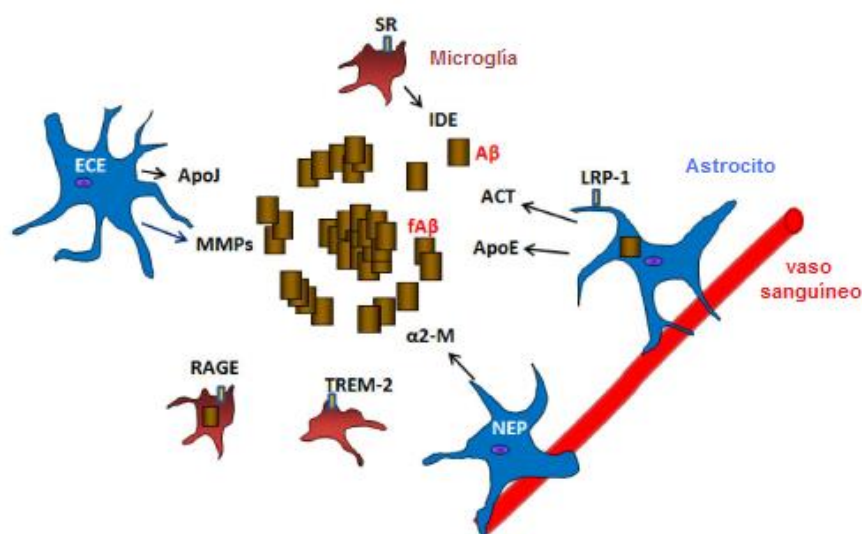


Figura 5. Esquema de los principales mecanismos de eliminación del péptido A β .

Se muestran las vías principales de degradación de A β (marrón) en estado monomérico (A β) y/o fibrilar (fA β) por actividad enzimática, producidas por astrocitos (azul) y microglía (granate): Neprelisina (NEP), enzima de degradación de insulina (IDE), enzima convertidora de endotelina (ECE) y metaloproteinasas (MMPs). Se indican también los receptores que median su endocitosis: SR, RAGE, TREM-2 y LRP1 y las chaperonas que pueden intervenir: α -1 antiquimotripsina (ACT), α -2-macroglobulina (α 2-M), apoJ y apoE. Así como la interacción de los pies astrocitarios con los vasos sanguíneos (rojo), a través de los cuales el A β puede ser drenado (sistema glinfático). Modificado de Ries and Sastre 2016.

1.3.3. ApoE y Enfermedad de Alzheimer

Se ha relacionado a apoE con la EA, ya que en las placas seniles halladas en los cerebros de los pacientes con EA se ha encontrado apoE asociada (Namba et al., 1991; Wisniewski and Frangione, 1992). Además, observando la frecuencia alélica del gen de apoE en una cohorte de pacientes con EA de tipo esporádico y sujetos controles envejecidos pero sin deterioro cognitivo, se llegó a establecer una relación entre la alta frecuencia de expresión del alelo ϵ 4 y

los pacientes con EA de tipo esporádico de forma dosis dependiente, ya que el alelo $\epsilon 4$ en homocigosis aumenta el riesgo a padecer EA diez veces y se adelanta la aparición de la enfermedad 15 años, frente a la expresión de $\epsilon 4$ en heterocigosis, donde el riesgo aumenta dos veces y la edad de aparición se adelanta 10 años (Corder et al., 1993; Roses, 1996; Weisgraber and Mahley, 2018). Ser portador de este alelo no confiere una predisposición absoluta, ya que existen casos de personas de avanzada edad con el alelo $\epsilon 4$ en homocigosis que no han desarrollado EA, por ello se ha establecido como un fuerte factor de riesgo genético, donde entran en combinación otros factores (Meyer et al., 1998). Por su parte, el alelo $\epsilon 2$ parece que protege frente al desarrollo de la enfermedad, incluso cuando se expresa en heterocigosis con el alelo $\epsilon 4$, o en individuos con síndrome de Down (Corder et al., 1994; Rohn, 2014). Polimorfismos de apoJ también actúan como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Lambert et al., 2009) y la lista de genes de riesgo potencial para el desarrollo de EA esporádica sigue aumentando en los últimos años (Pimenova et al., 2018), aunque hasta el momento la relación mas fuerte se ha establecido con el de apoE.

Se ha asociado a la apoE con el metabolismo de A β , ya que los niveles de A β 40 o A β 42 en el CSF correlacionan con el genotipo $\epsilon 4$ y la severidad de la enfermedad, tanto en humanos como en ratones que son modelo de la EA (Castellano et al., 2011; Prince et al., 2004; Strittmatter et al., 1993; Toledo et al., 2014; Youmans et al., 2012). Sin embargo, en un estudio reciente, los niveles de A β 42 en el CSF, aunque se asocian con la diagnosis de la EA, son independientes del genotipo de apoE (Lautner et al., 2014). Por ello, se ha propuesto que los niveles de apoE en el CSF pueden considerarse biomarcadores de la EA junto a los de A β y Tau, contemplados hasta el momento (Cruchaga et al., 2012; Toledo et al., 2014).

Gracias a los datos aportados por diferentes estudios se ha demostrado que apoE actúa sobre el metabolismo de A β a diferentes niveles. Sin embargo, muchos de estos hallazgos son contradictorios y hasta el momento existe mucha confusión acerca de cómo influye apoE, tanto en la expresión y procesamiento de APP hacia la producción de A β , como en su acumulación y aclaramiento en el cerebro.

Por un lado, un estudio *in vivo* muestra que las diferentes isoformas de apoE no afectan a los niveles de expresión de APP ni su procesamiento (Castellano et al., 2011). Mientras que, en otros estudios *in vitro* se ha observado que apoE, de manera isoforma dependiente (apoE4>apoE3>apoE2), induce la transcripción de APP (Huang et al., 2017) y su procesamiento al modificar la localización subcelular de APP, donde apoE4 es capaz de promover la internalización de APP incrementando la producción de A β más que apoE3 (Hopkins et al., 2011; Ye et al., 2005). Además, se ha propuesto que apoE estaría mediando este efecto a

través del receptor LRP1, por la interacción existente entre APP y este receptor (Ulery et al., 2000), pero en un estudio *in vivo* bloqueando la expresión de LRP1 en animales modelo de EA (Kanekiyo et al., 2013), no ven cambios en la producción de A β , por lo que podrían intervenir otros receptores de apoE que también interaccionan con APP (apoER2, SorLA) (Fuentealba et al., 2007; Ye et al., 2005).

Por otra parte, la relación más sólida entre apoE y A β se ha establecido en lo referente a los mecanismos de acumulación de A β , también con mucha controversia. En modelos animales se ha visto que apoE facilita la acumulación de A β , aunque no es esencial, y en humanos se ha asociado a apoE con una amiloidosis sistémica (Bales et al., 1997; Hu et al., 2015; Pankiewicz et al., 2014). Por todo ello, se ha llegado a proponer a apoE como una “chaperona patológica” (Wisniewski and Frangione, 1992) que facilita la acumulación de A β en el parénquima cerebral. Posteriormente, en cambio, se observó que hay más apoE asociada a A β en los cerebros de los controles sanos que en los cerebros de los pacientes con EA, lo cual llevó a los autores a proponer que apoE secuestra a A β y previene su agregación (Russo et al., 2002).

Gracias a los estudios *in vitro* se ha podido ahondar en los mecanismos por los cuales apoE interviene con la acumulación de A β , evidenciando que ambos se asocian, pero los complejos apoE-A β son más o menos estables en función de la isoforma de apoE que participe en la interacción. En los estudios iniciales de Strittmatter y colaboradores (Strittmatter et al., 1993), la isoforma apoE4 mostró más afinidad por A β que la apoE3. En contraposición, en un amplio número de trabajos se ha encontrado que apoE4 es la muestra menor afinidad por A β , y los complejos son menos estables, respecto a las otras isoformas de apoE (Gyls et al., 2003; Hori et al., 2015; LaDu et al., 1995; Wisniewski and Frangione, 1992; Yang et al., 1997). Como explicación a esta controversia, se ha propuesto que el estado de lipidación y naturaleza de apoE es importante, aunque este aspecto también se encuentra muy confuso todavía (Hu et al., 2015; Tokuda et al., 2000). A pesar de ello, se han explicado los resultados de Strittmatter y colaboradores señalando el bajo estado de lipidación de la apoE empleada, como consecuencia del proceso de purificación para su obtención (LaDu et al., 1995). Según esto, apoE en condiciones fisiológicas asociada a lípidos tendría más afinidad por A β y se comportaría de manera dependiente de isoforma correspondiendo con los hallazgos encontrados en los otros trabajos. No obstante, también existen estudios en los que apoE sin lipídico tiene mayor afinidad por A β (Beffert et al., 1999).

Se ha planteado que la asociación entre apoE y A β , podría influir en el proceso de fibrilización de A β . Tanto apoE2 como apoE3 impiden que se produzca el cambio conformacional necesario para su agregación durante la primera etapa de la fibrilización

(nucleación), ralentizando este proceso. Mientras que, cuando la asociación de A β se produce con apoE4 se acelera su fibrilización (Gylys et al., 2003; Hori et al., 2015; LaDu et al., 1995).

Por otro lado, cuando A β está unido a apoE2 y apoE3 se facilita su aclaramiento a través del LRP1 y LDLR, ambos receptores con una actividad endocítica rápida. Mientras que, cuando A β está unida a apoE4, la cual tiene menos afinidad por estos receptores y mayor por el VLDLR con una cinética más lenta, hace que la cantidad de A β internalizado sea menor (aclaramiento A β -ApoE2> A β -ApoE3> A β -ApoE4) (Deane et al., 2008; Kim et al., 2009). Sin embargo, posteriormente también se ha propuesto que, en condiciones fisiológicas, apoE no tiene afinidad por A β , y la forma soluble del péptido estaría compitiendo con apoE por su unión a los receptores, por lo que la presencia de apoE estaría impidiendo el aclaramiento de A β a través de los receptores de apoE, también isoforma dependiente donde apoE4 ejerce el mayor efecto de bloqueo de los receptores en comparación con otras isoformas (Verghese et al., 2013).

La degradación de A β por proteólisis también se ve modificada por apoE. Así, en pacientes con EA y fenotipo apoE4 se ha visto que hay una reducción de IDE comparado con los individuos que no expresan apoE4 (Cook et al., 2003). Además, en un estudio *in vitro* se describe que apoE interfiere con la degradación de A β también cuando está mediada por neprelisina (Jiang et al., 2008).

Así mismo, se han propuesto otros mecanismos independientes de A β por los que apoE estaría influyendo en la patología de la EA de manera isoforma dependiente. La apoE4, por sus características estructurales, es más susceptible al procesamiento proteolítico en el extremo C-terminal, generándose fragmentos truncados que son neurotóxicos *per se*, ya que promueven la desestabilización del citoesqueleto y función mitocondrial, y favorecen la fosforilación de la proteína Tau (Chang et al., 2005; Harris et al., 2003; Huang et al., 2001; Zhong et al., 2008).

1.3.4. IGF-I y Enfermedad de Alzheimer

Existe una fuerte correlación entre el descenso de los niveles circulantes de IGF-I que sucede progresivamente durante el envejecimiento, lo que promueve el descenso también en el CSF y pérdida de sensibilidad del SNC, con el aumento del deterioro cognitivo que padece la población envejecida (Markowska et al., 1998; Muller et al., 2012; Watanabe et al., 2005). Sin embargo, no se ha llegado a establecer una relación de causa-efecto entre ellos y también existen estudios que atribuyen el descenso en los niveles de IGF-I plasmáticos a un mecanismo de protección frente al desarrollo de problemas cognitivos durante el envejecimiento (Gubbi et al., 2018; Tumati et al., 2016).

De la misma manera, en condiciones patológicas que cursan con demencia como en la EA, tanto pacientes con la forma esporádica de EA, como ratones modelos de esta enfermedad, presentan en el cerebro un aumento de la expresión de IGF-IR, descenso de IGF-I y una demostrada resistencia a IGF-I que se ha relacionado con las deficiencias cognitivas asociadas a esta patología (Moloney et al., 2010; Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005; Talbot et al., 2012; Trueba-Sáiz et al., 2013; Zhang et al., 2013). Además, existe una fuerte relación entre padecer DMII, caracterizada por la resistencia a insulina a nivel periférico, y el aumento de riesgo a desarrollar EA (Arnold et al., 2018; Haan, 2006; Petrov et al., 2015) y el tratamiento intranasal con insulina revierte tanto los déficits cognitivos debidos al propio envejecimiento normal (Benedict et al., 2004) como en condiciones patológicas en pacientes con DMII con o sin desarrollo de EA (Claxton et al., 2015; Craft et al., 2012; Novak et al., 2014). Sin embargo, los hallazgos encontrados acerca de los niveles de IGF-I circulantes en estos pacientes son muy dispares, ya que aquellos que padecen la forma familiar de EA con mutaciones en APP presentan disminuidos los niveles de IGF-I plasmáticos (Mustafa et al., 1999), al igual que se ha encontrado en otros estudios con pacientes mayores de 60 años con EA, en comparación con controles sanos de la misma edad (Watanabe et al., 2005). Por lo que los bajos niveles plasmáticos de IGF-I se han asociado con un aumento del riesgo a desarrollar EA (Vidal et al., 2016). Sin embargo, en otros estudios los sujetos con EA tienen elevados los niveles de IGF-I plasmáticos en comparación con los sujetos controles (Tham et al., 1993). Esta variabilidad entre los diferentes estudios respecto a los niveles de IGF-I en la EA hace que no exista una tendencia clara (Gubbi et al., 2018; Ostrowski et al., 2016) y se ha atribuido la coexistencia con otras patologías, el tipo de dieta consumida o el género de los individuos que participan en cada uno de los estudios, como causas que puedan provocar la variabilidad en los niveles circulantes de IGF-I en cada individuo de forma independiente a la EA (Ostrowski et al., 2016; Paolisso et al., 1997). Además, se ha apuntado la importancia de considerar no solo los niveles totales de IGF-I, sino también su biodisponibilidad por su unión a las IGFBPs circulantes (Paolisso et al., 1997; Tham et al., 1993), debido a la condición de resistencia a IGF-I que se produce en el cerebro durante la EA que hace que los niveles plasmáticos de IGF-I no siempre se correspondan con una mayor acción en el cerebro, y los niveles de IGF-I presentes en el CSF de pacientes con EA también difieren entre los diferentes estudios (Ostrowski et al., 2016).

Por otra parte, el IGF-I interviene en el metabolismo de A β , pero no se ha definido completamente su acción ya que también existen evidencias discordantes. En algunos estudios *in vitro*, el IGF-I disminuye la expresión de la β -secretasa (Zhang et al., 2011), aumenta la producción de sAPP α y disminuye la de A β 40 (Adlerz et al., 2007). Estos efectos también son

propios de la insulina (Solano et al., 2000) y están mediados a través de la activación de la ruta PI3K-AKT, aunque también se ha encontrado que las MAPK pueden estar implicadas. A su vez, en ensayos *in vivo*, los ratones modelo de EA en los que se bloquea la expresión de IGF-I presentan mayor cantidad de A β en el cerebro, proponiéndose que IGF-I promueve el aclaramiento de A β a través de la BBB por incrementar las proteínas que actúan como chaperona como transtirretina (Carro et al., 2002). Por su parte, el IGF-IR interacciona físicamente con LRP1, a nivel de las células endoteliales (Nishijima et al., 2010) que, como se ha mencionado, está implicado en el aclaramiento de A β a este nivel (Zlokovic et al., 2010). En contraposición, otra vertiente de estudios muestran que tras la activación de la vía PI3K y otras quinasas por IGF-I e insulina, se incrementa la producción de A β (Freude et al., 2009; Gasparini et al., 2001; Gontier et al., 2015; Sajan et al., 2018) y bloqueando la señalización por IGF-I en las neuronas de animales modelo de EA, se favorece la neuroprotección con mejoría de las alteraciones cognitivas asociadas a la enfermedad (Gontier et al., 2015).

La proteína Tau es otra de las proteínas directamente relacionadas con la fisiopatología de EA, cuya forma hiperfosforilada favorece su acumulación intracelular con consecuencias neurotóxicas (Tracy and Gan, 2018). Tau es diana de diferentes quinasas que pueden mediar su fosforilación, pero principalmente está implicada la GSK3 β . Esta quinasa interviene en la ruta de señalización de IGF-I o insulina, y se inhibe tras la activación de PI3K por ambos ligandos, lo que descende la hiperfosforilación de Tau (Hong and Lee, 1997), y por tanto su neurotoxicidad.

Estas evidencias establecen una relación directa entre la señalización de IGF-I e insulina y la EA, pero aún están por esclarecer. Nuestro laboratorio, ha propuesto que la deficiencia en la señalización por IGF-I, debido a una resistencia a nivel de las células de la BBB, conduce en último término a la neuropatología asociada a la EA. Así, ante una incorrecta señalización por IGF-I, se produce una ineficiencia de los mecanismos de aclaramiento de A β y su acumulación, se favorece la hiperfosforilación de Tau, descende la neuroprotección y supervivencia celular, conduciendo todo ello a un estado neuropatológico (Carro and Torres-Aleman, 2004). Además, hemos propuesto que el nivel de llegada de IGF-I al cerebro desde la periferia podría considerarse como un biomarcador de la EA, ya que se encuentra reducido (Trueba-Sáiz et al., 2013).

Teniendo presentes todos estos antecedentes a cerca de la resistencia a insulina que se produce en la EA, los controvertidos datos que se han obtenido sobre la terapia relacionada con su señalización, así como su semejante y menos explorado, el IGF-I, junto con el potencial factor de riesgo genético que supone poseer el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ para el desarrollo de la EA de

tipo esporádico, consideramos que es fundamental estudiar posibles mecanismos comunes que conduzcan a destapar aspectos de esta compleja enfermedad, y en concreto, aquellos que implican al péptido A β .

2

Hipótesis y objetivos



La hipótesis general que postulamos en esta tesis doctoral es que existe una interacción entre el IGF-I y la apoE, que desempeña un papel relevante en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

Para contrastar esta hipótesis, nos proponemos los siguientes objetivos:

OBJETIVO PRINCIPAL 1: Evaluar la modulación por apoE del transporte de IGF-I por células cerebrales y su señalización.

Objetivos específicos:

- Analizar si diferentes isoformas humanas de apoE, en concreto apoE2, que se ha visto que protege frente al desarrollo de EA, y apoE4, que actúa como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, influyen en la captura de IGF-I a través de células que componen la barrera hematoencefálica y en su transcitosis a través de un sistema *in vitro* que simula la barrera hematoencefálica.
- Analizar cómo la obesidad, que eleva los niveles circulantes de apoE, influye sobre la entrada de IGF-I al cerebro en ratones.
- Estudiar si la señalización intracelular por IGF-I en células cerebrales se encuentra modificada por la presencia de apoE2 o apoE4, y si afecta a las funciones celulares que IGF-I desempeña.

OBJETIVO PRINCIPAL 2: Evaluar la interacción entre el sistema IGF-I y apoE en los mecanismos implicados en la producción y eliminación del péptido β -amiloide.

Objetivos específicos:

- Analizar cómo el receptor de IGF-I está afectando a la regulación del procesamiento de APP, examinando las interacciones entre ambas proteínas y el efecto que IGF-I y apoE podrían estar ejerciendo.
- Averiguar si los mecanismos celulares de aclaramiento de β -amiloide promovidos por IGF-I y apoE se encuentran conectados.

OBJETIVO PRINCIPAL 3: Evaluar la modulación de la producción de apoE por IGF-I.

Objetivo específico:

- Medir la expresión y liberación de apoE en astrocitos en cultivo tras la estimulación con IGF-I.

3

Material y Métodos



3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. Reactivos y medios de cultivo

MEDIOS DE CULTIVO		
Abreviatura	Nombre	Fabricante
EBSS	Solución salina equilibrada de Earle (del inglés, Earle's Balanced Salt Solution)	GIBCO
DMEM/F12	Eagle modificado de Dulbecco con la mezcla de nutrientes F-12 (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12)	
HE-SFM	Medio de endotelio humano sin suero (del inglés, Human Endothelial-Serum Free Medium)	
NB	Neurobasal	

Tabla 2. Listado de medios de cultivo empleados para los diferentes tipos celulares.

REACTIVOS			
	Nombre	Concentración de uso	Fabricante
Enzimas	Colagenasa II	270 U/ml (RBEC) 90 U/ml (Hepatocitos)	GIBCO
	Dispasa II	100 mg/ml	Roche
	DNAsa	100 U/ml (Neuronas) 10 U/ml (RBEC) 12,5 µg/ml (Plexo)	Sigma Aldrich
	Pronasa	1 mg/ml	
	Papaína	12 U/ml	Worthington
	Tripsina-EDTA	0,05%	GIBCO
Matriz de soporte celular	Colágeno IV	25 µg/ml	Sigma Aldrich
	Fibronectina	5 µg/ml	
	Laminina	10 µg/ml	
	Poli-L-lisina		
Suplementos	Hidrocortisona	1 µg/ml	Sigma Aldrich
	Puromicina	3 µg/ml	
	Suplemento B27	1X	GIBCO
	L-Glutamina	4 mM	Sigma Aldrich
	Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del ingles Basic Fibroblast Growth Factor)	5 ng/ml (Plexo) 2 ng/ml (RBEC)	
	Factor de crecimiento epitelial (EGF, del inglés Epidermal Growth Factor)	10 ng/ml	
	Suero fetal bovino inactivado (FBS del inglés, Fetal Bovine Serum)	10%	
	Suero de caballo inactivado (HS del inglés, Horse Serum)		
	Penicilina Estreptomicina	100 U/ml 100 µg/ml	GIBCO

Tabla 3. Listado de reactivos empleados para el cultivo de los diferentes tipos celulares.

Se detallan las enzimas empleadas para la digestión del tejido en la obtención de las células (Enzimas), las proteínas empleadas para recubrir los pocillos previamente a sembrar las células (Matriz de soporte celular) y los factores tróficos u otros suplementos con los que se ha enriquecido los medios de cultivo descritos en la tabla 2, para favorecer el crecimiento celular (Suplementos).

3.1.2. Cultivo primario de células endoteliales de cerebro de rata (RBEC, del inglés *Rat Brain endothelial cells*)

Se ha utilizado rata Wistar entre 7 y 9 días postnatal (P7-P9). Tras la extracción del cerebro, se eliminan las meninges y se disecciona la corteza cerebral manteniendo el tejido en EBSS frío. A continuación, se disgrega el tejido mecánicamente cortando con un bisturí y se incuba durante 90 minutos a 37 °C, en agitación a 280 r.p.m. con medio de digestión enzimático: DMEM/F12, suplementado con colagenasa II, dispasa y DNasa (10 U/ml) (Tablas 2 y 3). Finalmente, se vuelve a disgregar mecánicamente pasándolo por una aguja estéril 21G y se centrifuga a 1000 r.p.m., 5 minutos. Las células se siembran en una placa multipocillos (Falcon) recubiertos de colágeno y fibronectina en medio HE-SFM suplementado con FBS, hidrocortisona y puromicina (Calabria et al., 2006; Furihata et al., 2015) (Tablas 2 y 3) y se incuban a 37 °C en atmosfera húmeda y CO₂ (5%). Transcurridas 24 horas, se lavan con tampón fosfato salino (PBS, del inglés, *phosphated buffered saline*) pH 7,4 y se les añade de nuevo el mismo medio. Transcurridas 48 horas más, se sustituye por medio de crecimiento: HE-SFM con FBS (10%), hidrocortisona, bFGF (2 ng/ml) y penicilina/estreptomicina (Tablas 2 y 3), reemplazándose cada 48 horas, hasta el día 7 de cultivo, que las células se encuentran formando una monocapa con una confluencia aproximada del 80% (Fig. 6). Antes de realizar los diferentes tratamientos, según el tipo de experimento, se retira el medio, se lavan con PBS y se mantienen en medio DMEM/F12 libre de suero durante 3 horas.

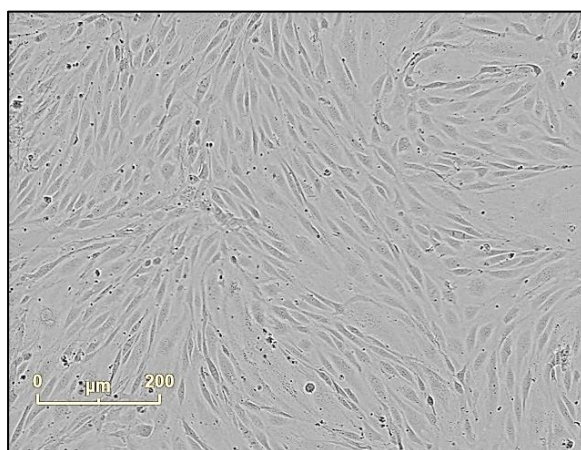


Figura 6. Microfotografía de monocapa de células endoteliales.

Corresponden a 7 días de cultivo, tomada con el equipo IncuCyte® (Essen BioScience). La barra de escala corresponde con 200 µm.

Para los experimentos de transcitos, las células endoteliales en el día 7 de cultivo se levantan con tripsina y se siembran 5×10^4 células/cm² sobre insertos (Millicell® *Cell culture Inserts*, EMD Millipore) con una membrana de PET (del inglés, *PolyEthylene Terephthalate*) y 0,4 µm, previamente recubiertos de colágeno y fibronectina. Las células se mantienen en las

mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente, hasta que se alcanza una resistencia eléctrica transendotelial (TEER, del inglés *Transendothelial Electrical Resistance*) aproximada de $100 \Omega/\text{cm}^2$ medida con Millicell® ERS (EMD Millipore) (Perrière et al., 2007). En este sistema de cultivo, las células sembradas se disponen con el lado luminal hacia el interior del inserto y el lado abluminal de la monocapa hacia el exterior del inserto (Bicker et al., 2014) (Fig. 7).

Previamente a la realización de los experimentos de transcitosis de IGF-I y A β 40-HiLyte Fluor™ 488, se comprueba la permeabilidad de la membrana evaluando el paso de FITC-dextrano (del inglés, *Fluorescein IsothioCyanate-dextran*) de 70 KDa. Para ello, se renueva el medio de cultivo, y transcurridos 30 minutos, se añade FITC-dextrano ($3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Sigma Aldrich). Tras 2 horas de incubación, se recoge el medio fuera del inserto y se analiza la fluorescencia del dextrano con el equipo FLUOStar OPTIMA (Excitación (Exc.): 485 nm/ Emisión (Em.): 520 nm) (Balda and Matter, 2007).

Tanto para la evaluación de la TEER como el paso de FITC-dextrano, se toma un pocillo-inserto sin células sembradas como valor de referencia (blanco).

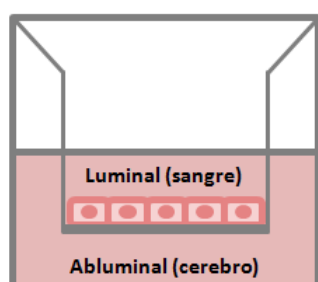


Figura 7. Esquema del sistema de cultivo con insertos Millicell®.

En el interior del inserto, sobre la membrana, quedan sembradas las células endoteliales con la misma polarización en la que se disponen en el endotelio cerebral, simulando el interior del inserto como el lado orientado en contacto con la sangre (luminal), y el lado del exterior del inserto como el orientado hacia el cerebro (abluminal). Modificada de Bicker et al., 2014.

3.1.3. Cultivo primario de células epiteliales del plexo coroideo de rata

Se ha utilizado rata Wistar P2-P4. Tras la extracción del cerebro, se diseccionan los plexos coroideos localizados en los 4 ventrículos cerebrales manteniendo el tejido en EBSS frío. A continuación, se digieren enzimáticamente, con una solución de PBS con pronasa y DNAsa ($12,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Tabla 3), durante 10 minutos, a 37°C y en agitación a 200 r.p.m. Tras ello, se digieren mecánicamente con una pipeta Pasteur de vidrio con la punta afinada con calor, y la suspensión celular se filtra por una malla de Nylon de $70 \mu\text{m}$. Por último, se centrifuga a 1000 r.p.m., 5 minutos y las células se resuspenden en medio DMEM/F12 suplementado con FBS. Se repite la centrifugación, al menos tres veces, para lavar las células antes de sembrar $3,75 \times 10^4$ células/ cm^2 en medio DMEM/F12 suplementado con FBS, bFGF ($5 \text{ ng}/\text{ml}$), EGF y

penicilina/estreptomicina en una placa multipocillos recubiertos de laminina (Carro et al., 2002) (Tablas 2 y 3). Se incuban a 37 °C, CO₂ (5%) y atmosfera húmeda, reemplazando el medio cada 72 horas hasta que se alcanza una confluencia aproximada del 80% (Fig. 8). En ese momento, se retira el medio, se lavan con PBS y se mantienen en medio DMEM/F12 libre de suero durante 3 horas, antes realizar los tratamientos para los diferentes ensayos.

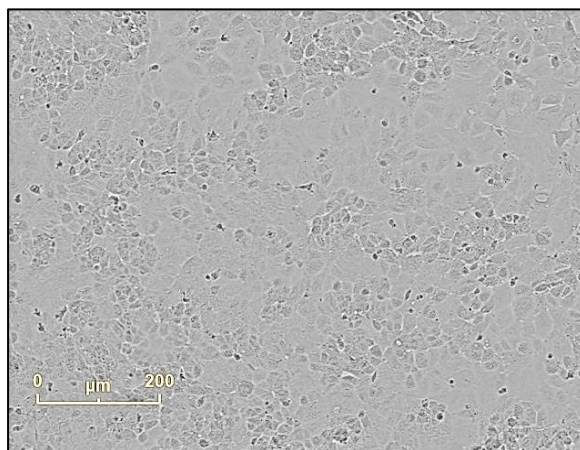


Figura 8. Microfotografía de monocapa de células epiteliales de plexo coroideo. Corresponden a 5 días de cultivo, tomada con el equipo IncuCyte® (Essen BioScience). La barra de escala corresponde con 200 μm.

3.1.4. Cultivo primario de células gliales de corteza cerebral de rata

Se ha utilizado rata Wistar P0-P1. Tras la extracción del cerebro, se eliminan las meninges y se diseccionan las cortezas cerebrales manteniendo el tejido en EBSS frío. Se disgrega el tejido mecánicamente pasando por pipeta Pasteur con la punta afinada con calor y, tras dejar reposar 5 minutos en frío, se recoge el sobrenadante que se centrifuga a 1000 r.p.m., 5 minutos. Las células se resuspenden en medio DMEM/F12, suplementado con FBS, HS y penicilina/estreptomicina (Tabla 3). Se siembra la suspensión celular en un flask de 75 cm², que se mantienen en las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente. Cuando se alcanza la confluencia, se agita a 210 r.p.m. y 37 °C, durante 3 horas para obtener las células de microglía.

Tras la agitación, el medio de cultivo enriquecido en microglía se centrifuga a 1000 r.p.m., 5 minutos y se resuspenden las células en medio DMEM/F12 suplementado con FBS, HS y penicilina/estreptomicina (Tabla 3). Se siembran $12,5 \times 10^4$ células/cm² en una placa multipocillos recubiertos con poli-L-Lisina (Mecha, 2011) y se incuban durante 72 horas a 37°C, CO₂ (5%) y atmosfera húmeda. Transcurrido este tiempo, se mantienen en medio DMEM/F12 libre de suero durante 3 horas y se realizan los ensayos de internalización de Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 (AnaSpec).

Sobre la monocapa celular que permanece en el flask, se añade de nuevo medio de cultivo y continúa agitándose a 280 r.p.m. durante 15 horas para purificar los astrocitos. Tras eliminar el medio, las células se levantan con tripsina y se siembran $3,75 \times 10^4$ células/cm² en una placa multipocillos, con el mismo medio de crecimiento y condiciones en el que se han mantenido hasta ahora, reemplazando el medio cada 4 días. Cuando se alcanza una confluencia del 80%, previamente a hacer los tratamientos, la monocapa se mantiene durante 3 horas en medio DMEM/F12 libre de suero.

3.1.5. Cultivo primario de neuronas de corteza cerebral de rata

Se ha utilizado rata Wistar P0. Tras la extracción del cerebro, se eliminan las meninges y se diseccionan las cortezas cerebrales manteniendo el tejido en EBSS frío. Seguidamente, se disgrega el tejido mecánicamente con bisturí y se incuba durante 60 minutos a 37 °C en agitación a 200 r.p.m., con EBSS suplementado con papaína activada y DNAsa (100 U/ml) (Tabla 3), en atmósfera acidificada con carbógeno. A continuación, se inactiva la papaína con inhibidor (Worthington) (10%) y se centrifuga a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Las células se resuspenden en NB, suplementado con glutamina y B27 (Tablas 2 y 3), y se repite la centrifugación al menos dos veces para lavar las células. Finalmente, se siembran $12,5 \times 10^4$ células/cm² en una placa multipocillos recubiertos con poli-L-Lisina, y se incuban a 37 °C, CO₂ (5%) y atmosfera húmeda. Se reemplaza el medio a las 72 horas y en el día 7 de cultivo, previamente a hacer los tratamientos para los diferentes ensayos, se mantienen las neuronas durante 2 horas en medio NB suplementado sólo con L-glutamina.

3.1.6. Cultivo primario de hepatocitos de ratón

En este caso, debido al gran tamaño del órgano donante, y el requerimiento de trabajar con animales adultos, se ha utilizado ratón C57BL/6 de 8 semanas de edad. Tras anestesiar al animal con pentobarbital (50 mg/Kg), se expone la vena porta hepática, se realiza una ligadura en la parte distal y por encima de ésta, se canula (25G, Venofix®) pasando una solución de NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), KH₂PO₄ (1,2 mM), NaHCO₃ (25 mM), glucosa (5,5 mM) y EGTA (0,5 mM) a 37 °C y realizando un corte en la vena cava inferior, para abrir el circuito. Seguidamente, se pasa una solución con la misma composición, en la que se sustituye el EGTA por CaCl₂ (2 mM), MgSO₄ (1,2 mM) y colagenasa (90 U/ml) a 37 °C. Se disecciona el hígado, se rompe la cápsula de Glisson y se extraen los hepatocitos en DMEM/F12 con FBS y penicilina/estreptomicina (Tabla 3). Posteriormente, se filtra por una malla de Nylon de 70 µm, se centrifuga a 60 x g durante 5 minutos y las células se resuspenden en DMEM/F12 con FBS,

sobre el que se añade Percoll® (Sigma Aldrich) (45%). Se centrifuga a 200 x g durante 10 minutos y de nuevo se resuspenden las células en DMEM/F12 con FBS (Tablas 2 y 3). Se repite la centrifugación al menos tres veces para lavar las células, antes de sembrar $8,25 \times 10^4$ células en el mismo medio de cultivo, en una placa multipocillos recubiertos de colágeno (Mudra and Parkinson, 2004). Se incuban a 37 °C, CO₂ (5 %) y atmosfera húmeda durante 48 horas (Fig. 9), momento en el que se reemplaza el medio por DMEM/F12 libre de suero durante 3 horas antes de realizar los experimentos de internalización de HiLyte Fluor™ 488.

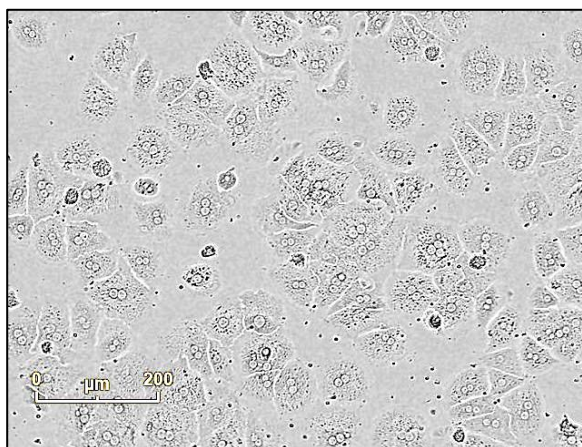


Figura 9. Microfotografía de hepatocitos de ratón.

Corresponden a 24 horas de cultivo, tomada con el equipo IncuCyte® (Essen BioScience). La barra de escala corresponde con 200 μm.

3.2. TRATAMIENTOS CELULARES

3.2.1. Lipidación de isoformas de apoE humana

Las isoformas de apoE2 y apoE4 recombinantes (Sigma Aldrich) se lipidan con dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (Avanti® Polar Lipids), para semejarlas a su estado fisiológico (Gyls et al., 2003). Previamente, se forman vesículas de DMPC disolviéndolo en cloroformo (10 mg/ml), se seca bajo una corriente de N₂ y se reconstituye (5 mg/ml) en Tris-HCl (1 mM) pH 7,6, NaCl (150 mM) y EDTA (10 mM) (Innerarity et al., 1986). Se sonica hasta que se convierte en una solución translúcida y se filtra a través de una membrana de 0,22 μm (Millipore). Tras ello, se mezcla cada isoforma de apoE con las vesículas de DMPC siguiendo la proporción 1:2,5 (g apoE/g DMPC, respectivamente) y se incuba durante 1 hora a 24 °C.

Cada tipo celular, se trata con apoE2-DMPC o apoE4-DMPC (100 nM) que corresponde con la concentración fisiológica de apoE en el CSF (Minami et al., 2010), o lo equivalente de DMPC solo (0,85 μg/μl), para los ensayos de internalización de IGF-I, de asociación entre IGF-IR y LRP1 y de expresión génica de APP. Ya que, en el resto de los ensayos, se han empleado las isoformas de apoE sin lipidar y a la misma concentración.

3.2.2. Ensayos de internalización de IGF-I humano

Se ha empleado IGF-I humano recombinante biotilado (bhIGF-I) (lbt systems) (0,2 µg/ml) (Trueba-Sáiz et al., 2013), que se ha añadido al medio de cultivo 1 hora después del tratamiento con apoE-DMPC, DMPC, o solo (basal). Tras permitir a las células (RBEC y plexo coroideo) internalizarlo durante 1 hora a 37 °C, se lavan con PBS pH 6,0, para eliminar los restos de IGF-I adheridos a la superficie celular, y posteriormente con PBS pH 7,4. Por último, las células se lisan en tampón Tris-HCl (20 mM) pH 7,4, NaCl (150 mM), EDTA (5 mM), Nonidet P-40 (Roche) (1%), PMSF (1 mM), inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y o-vanadato sódico (1 mM). Se centrifugan a 14.000 r.p.m., 10 minutos a 4 °C y se recoge la fracción de proteína soluble donde se analiza el bhIGF-I mediante Western Blot (Apartado 3.3.2).

En los ensayos de transcitos de bhIGF-I en células endoteliales, se realizan los mismos tratamientos en el interior del inserto (lado luminal), junto con un pocillo en el que solo se añade bhIGF-I (basal) y otro pocillo en el que no hay células sembradas en el inserto. Se permite a las células transportar el bhIGF-I durante 1 hora a 37 °C y posteriormente se recoge todo el medio del exterior al inserto, que se liofiliza con el equipo Sentry™ (Virtis) y se reconstituye en Tris-HCl (10 mM) pH 7,4 para analizar mediante Western blot el bhIGF-I presente.

Para evaluar la modulación de apoE sobre el efecto de Aβ en la internalización de IGF-I, junto con el tratamiento con apoE-DMPC, se hace el tratamiento con Aβ40 recombinante humano (Sigma Aldrich) soluble en tampón fosfato (50 mM) pH 7,4, que se añade sobre el medio de cultivo libre de suero a una concentración de 5 µM.

3.2.3. Estudio de las vías de señalización intracelulares de IGF-I

Las células (endotelio, plexo coroideo, astrocitos y neuronas) se tratan con hIGF-I (1 nM) solo (basal) o junto a apoE2 o apoE4, durante 1 hora. Posteriormente se lisan en el mismo tampón descrito en el apartado anterior y se analiza mediante Western Blot la inmunodetección de AKT, ERK1/2, AKT fosforilada en Ser473, y ERK1/2 fosforilada en Thr202/Tyr204.

3.2.4. Estimulación de astrocitos con IGF-I

Para evaluar la producción de apoE por los astrocitos de rata, se estimulan las células con IGF-I recombinante humano (hIGF-I) (Peprotech) (1nM) durante 24 horas. Esta dosis equivale a la concentración fisiológica de IGF-I en el SNC (Talbot et al., 2012). Transcurrido el tiempo, se recoge el medio de cultivo (500 µl), se concentra 10 veces (Amicon®, Millipore) y las células se

lisan en el tampón descrito en el apartado 3.2.2. Tras centrifugar a 14.000 r.p.m., 10 minutos a 4°C, se analizan los niveles de apoE presentes, en el medio de cultivo y en el extracto de proteína, mediante Western Blot.

Para estudiar la expresión génica de apoE, el tratamiento con IGF-I se realiza durante 6, 15 y 24 horas, transcurridas las cuales, los astrocitos se procesan para extraer el ARN y realizar PCR cuantitativa (Apartado 3.4.1).

3.2.5. Análisis del procesamiento del APP

Los astrocitos y neuronas se tratan con hIGF-I (1 nM) solo (basal), o junto a apoE2 o apoE4, durante 24 horas. Posteriormente se recoge el medio de cultivo (1 ml), se añaden inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y o-vanadato sódico (1 mM). Se centrifuga a 14.000 r.p.m., 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se concentra 20 veces (Amicon®, Millipore), que se analiza mediante Western Blot para inmunodetectar la proteína APP soluble (sAPP).

El estudio de la expresión génica de APP se realizó en cultivos independientes respecto a los empleados para analizar el procesamiento. De la misma manera, el tratamiento de las células se realiza durante 24 horas con hIGF-I (1 nM) solo (basal), o junto a apoE2 o apoE4, pero en este caso asociadas a DMPC, como se detalla en el apartado 3.2.1. Posteriormente se procesan para extraer el ARN y realizar PCR cuantitativa.

3.2.6. Ensayos de internalización de A β 40

Las células (astrocitos, microglía y hepatocitos) se tratan durante 15 horas con A β 40-HiLyte Fluor™ 488 soluble (AnaSpec) (500 nM) solo (basal) y junto a apoE2 o apoE4 recombinante (sin lipídico) (100 nM) en presencia de hIGF-I (1 nM) en el caso de la glía, y se incrementa la dosis de hIGF-I a 10 nM en el caso de los hepatocitos, manteniéndolas en las mismas condiciones de cultivo, y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se lavan con PBS pH 6,0 y posteriormente PBS pH 7,4. Se incuba con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) (1:500) en PBS pH 7,4 durante 5 minutos y manteniendo las células vivas, se adquieren imágenes de la fluorescencia emitida con el microscopio DMI 6000 (Leica) (Hoeschst Exc: 350 nm/ Em: 461 nm y A β 40-HiLyte Fluor™ Exc: 503 nm/ Em: 528 nm). Posteriormente, se lisan en el mismo tampón descrito en el apartado 3.2.2 y, tras la centrifugación a 14.000 r.p.m., 10 minutos y 4 °C, se cuantifica la fluorescencia presente en el extracto proteico, con el equipo FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech) (Exc: 485 nm/ Em: 520 nm).

En los ensayos de transporte de A β 40 por transcitosis en células endoteliales, se añade A β 40-HiLyte Fluor™ 488 soluble (500 nM) solo (basal) y en presencia de hIGF-I (1 nM) junto a

apoE2 o apoE4 recombinante sin lipídico (100nM), en el lado abluminal (Fig. 7). Transcurridas 15 horas, se recoge el medio en el interior del inserto (lado luminal) y se mide la fluorescencia presente con el equipo FLUOStar OPTIMA.

3.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA

3.3.1. Ensayos de viabilidad celular

Se han tratado las células (RBEC, plexo coroideo y astrocitos) con apoE2 o apoE4 recombinante (sin lipídico) (100 nM) en presencia o ausencia de hIGF-I (1 nM) o sin ningún tratamiento (basal), durante 24 o 48 horas, manteniendo las células en las mismas condiciones de incubación de cultivo. Transcurrido el tiempo correspondiente, se añade el reactivo “CellTiter 96® AQueous One Solution” (Promega), y tras 2 horas se mide la absorbancia a 490 nm con el equipo Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific).

Este método está basado en la formación del producto final formazán, coloreado y soluble en el medio de cultivo, a partir de la reducción de una sal de tetrazolio (MTS, del inglés *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt*) combinado con un aceptor de electrones (PES, del inglés *phenazine ethosulfate*). La reducción del compuesto se produce por las células metabólicamente activas (Fig. 10), por tanto, la coloración del medio debido a la cantidad de formazán producido, es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

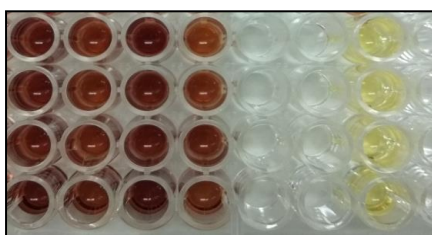


Figura 10. Fotografía del ensayo de viabilidad celular.

Se observa la coloración debida a la producción de formazán, en función de la viabilidad celular inducida por los diferentes tratamientos. A la derecha, se muestra la coloración del reactivo en ausencia de células.

3.3.2. Western blot

Los extractos de proteína procedentes de los diferentes lisados celulares, o medios de cultivo, se desnaturalizan a 100°C durante 5 minutos en tampón Laemmli: Tris-HCl (70 mM) pH 6,8, sal sódica de dodecilsulfato (SDS, del inglés *Sodium Dodecil Sulfate*) (1%), glicerol (10%) azul de bromofenol (0,005%) y β-mercaptoetanol (1%). A continuación, se someten a electroforesis (Mini-protean III, BioRad) en presencia de SDS (1%) con geles de Tris-HCl acrilamida/bis-acrilamida de porcentaje variable, según el tamaño de la proteína que se pretenda detectar: 10% (>75 KDa), 12% (20-75 KDa) o 16% (<20 KDa). Tras la electroforesis, la

proteína se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) de 0,2 μm , en el caso de la detección de proteínas pequeñas (<20 KDa), o 0,45 μm para las demás proteínas, y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) (Sigma Aldrich) (5%) en tampón TTBS (del inglés, *Tween-Tris Buffered Saline*): Tris-HCl (50 mM) pH 7,4, NaCl (200 mM) y Tween-20 (Sigma Aldrich) (1%). El anticuerpo primario correspondiente para detectar la proteína de interés (Tabla 4), se incuba en TTBS con azida sódica (0,05%), durante 15 horas a 4 °C en agitación. Tras lavar la membrana, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, con un anti-IgG-IRDye®(LI-COR) (1:20.000) diluido en TTBS, frente a la especie correspondiente al hospedador en el que se haya generado el anticuerpo primario. Tras lavar la membrana y dejar secar, se adquiere la imagen con el equipo ODYSSEY (LI-COR). Posteriormente, se re-incuba la membrana con anticuerpo frente a β -actina (Tabla 4) y un anti-IgG ratón-IRDye®(LI-COR) (1:20.000), siguiendo el mismo procedimiento. La señal obtenida correspondiente a la β -actina se considera como proteína total, excepto en el caso de la detección de las proteínas de señalización por IGF-I que, tras la detección de las formas fosforiladas, se elimina el anticuerpo unido incubando 5 minutos con la solución “Re-Blot plus Mild solution” (Invitrogen) en H₂O destilada y la membrana se re-incuba con anti-AKT, o Anti-ERK1/2 (Tabla 4). El valor de estas señales es el que se han tomado como proteína total respecto a sus formas fosforiladas, en cada caso.

Para la inmunodetección del bhIGF-I, tras incubar la membrana de nitrocelulosa con BSA, se incuba con Estreptavidina-IRDye®(LI-COR) (1:5.000) en TTBS, durante 15 horas a 4 °C y se procede de la misma manera para capturar la imagen. Tras ello, antes de reincubar con anti- β -actina, es necesario retirar la estreptavidina unida, como anteriormente se ha descrito.

ANTICUERPOS WESTERN BLOT				
Proteína	Dilución de uso	Hospedador		Fabricante
AKT fosfoSer473	1:1.000	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
AKT (pan)		Ratón	Monoclonal	
ApoE	1:2.000	Cabra	Policlonal	Calbiochem
APP (22C11)		Ratón	Monoclonal	Millipore
ERK1/2	1:1.000	Conejo	Policlonal	Cell Signaling
ERK1/2 fosfoThr202/ fosfoTyr204		Conejo	Monoclonal	
FosfoTyr (PY20)	1:500	Ratón	Monoclonal	BD Transduction Lab.
IGF-1R (D23H3) XP®	1:1.000	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling
LRP1 (EPR3724)	1:2.000	Conejo	Monoclonal	Abcam
β -Actina	1:20.000	Ratón	Monoclonal	Sigma Aldrich

Tabla 4. Listado de anticuerpos empleados para Western blot.

Se detallan los anticuerpos primarios, frente a la proteína de interés, empleados para incubar la membrana de nitrocelulosa durante la técnica de Western blot, la dilución empleada, así como la especie del hospedador en la que están generados.

Para estudiar el procesamiento de APP se han usado geles de tricina 4-20% (Novex, Invitrogen) y tampón de electroforesis con tricina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína se ha transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm y se ha seguido el mismo procedimiento, como en el caso de las otras proteínas.

Tras capturar las imágenes, en todos los casos se ha obtenido el valor de densidad óptica (D.O.) de cada proteína, empleando el software Image Studio Lite 5.2 (LI-COR) y se ha calculado el valor de D.O./ mm^2 de la proteína de interés, respecto al valor de D.O./ mm^2 de la proteína total.

3.3.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Se ha cuantificado los niveles de apoE e IGF-I plasmáticos de ratones con sobrepeso y controles (Apartado 3.5.2), empleando un Kit de ELISA que proporciona los reactivos necesarios para inmunodetectar la proteína en solución, siguiendo las instrucciones recomendadas por cada fabricante. Para el ELISA de apoE, las muestras de suero se diluyen 5 x 10^4 veces, se analizan con el kit (Abcam) y se registra la absorbancia emitida a 450 nm con el equipo FLUOStar OPTIMA. En el caso de la detección del IGF-I, el suero se diluye 500 veces, se analiza con el kit (R&D Systems®) y se registra la absorbancia a 450 nm corrigiendo por la registrada a 540 nm, según recomienda el fabricante.

3.3.4. Inmunoprecipitación de proteínas

Las células (astrocitos y neuronas) tras estar en medio libre de suero durante 3 horas se lisan en tampón Tris-HCl pH 7,4 (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), Nonidet P-40 (1%), Triton X-100 (1%) (Sigma Aldrich), PMSF (1 mM), inhibidores de proteasas y o-vanadato sódico (1 mM). También se empleó tejido procedente de corteza cerebral de animales C57BL/6, que se homogeniza en el mismo tampón empleando un triturador mecánico (Ultra-Turrax®, Ika).

El homogeneizado y los lisados celulares, se centrifugan a 14.000 r.p.m., 10 minutos a 4°C y la proteína obtenida se incuba con anticuerpo frente a la región extracelular del APP (clon 22C11, Millipore) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15 horas a 4 °C. Posteriormente, se añade proteína A/G anclada a agarosa (Santa Cruz) y se incuba durante 2 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifuga 5000 x g, 5 minutos a 4 °C y se repite la centrifugación hasta tres veces, lavando las agarosas cada vez con tampón Tris-HCl pH 7,4 (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA (1 mM) y EGTA (1 mM). En la última centrifugación, tras eliminar el sobrenadante, se añade tampón Laemmli

con β -mercaptoetanol (5%), y se calienta a 100 °C durante 10 minutos. Se centrifuga 2 minutos a 10.000 r.p.m., para depositar las agarosas. El sobrenadante se analiza por Western Blot, inmunodetectando el IGF-IR (Cell Signaling) y APP (Millipore) (Tabla 4). En este caso, no se han densitometrado las imágenes obtenidas ya que se pretende hacer un estudio cualitativo de la existencia de la interacción entre ambas proteínas.

También se ha realizado la inmunoprecipitación de LRP1 en células endoteliales. Para ello, las células se tratan con apoE2-DMPC o apoE4-DMPC en presencia o ausencia de hIGF-I (1 nM) o sin ningún tratamiento (basal) durante 1 hora, tras la cual, se lisaron en el mismo tampón descrito anteriormente, sustituyendo los inhibidores de proteasas por leupeptina (Sigma Aldrich). El extracto de proteína obtenido se incubaba con anticuerpo frente a LRP1 (clon EPR3724, Abcam) (2,5 μ g/ml) y se sigue el mismo procedimiento descrito en el caso anterior. Finalmente, mediante Western Blot se inmunodetectan el IGF-IR y LRP1 (Tabla 4) y las imágenes obtenidas se densitometran para calcular el valor de densitometría de IGF-IR presente, respecto al valor de densitometría de LRP1 inmunoprecipitado.

Por otra parte, se ha homogeneizado el hipocampo obtenido de animales obesos y control sometidos o no a enriquecimiento ambiental (Apartado 3.5.2B) y en el extracto proteico se ha inmunoprecipitado el IGF-IR, incubado con 5 μ g/ml de anticuerpo frente a la cadena β del IGF-IR (Cell signaling), siguiendo el mismo procedimiento que en los casos anteriores. Tras analizar las muestras por Western blot, se inmunodetecta el IGF-IR inmunoprecipitado y su fosforilación en Tyr (clon PY20, Transductions laboratories) (Tabla 4).

3.3.5. Ensayo de ligación por proximidad (PLA, del inglés *Proximity Ligation Assay*)

La técnica de PLA permite estudiar la interacción entre dos proteínas inmunodetectadas con anticuerpos primarios específicos frente a cada una de ellas. Éstos a su vez van a ser reconocidos por anticuerpos secundarios asociados a oligonucleótidos y amplificados mediante una polimerasa y que, necesariamente, han tenido que ser ligados previamente formando un ADN circular, para que se produzca la amplificación. Por tanto, la polimerasa sólo tiene actividad cuando las proteínas se encuentran muy próximas entre sí. En el último paso de la reacción, durante la amplificación, hibridan oligonucleótidos fluorescentes, lo que permite su visualización (Fig. 11).

Para conservar la especificidad de la técnica, es imprescindible que los anticuerpos primarios de las dos proteínas detectadas hayan sido generados en especies diferentes, por lo que se ha utilizado un anticuerpo generado en ratón, para detectar la proteína APP (clon 22C11, Millipore) y un anticuerpo generado en conejo, para detectar el IGF-IR (clon N-20,

Santa Cruz). Ambos anticuerpos reconocen epítomos en la región extracelular de la proteína frente a la que van dirigidos.

Las células (astrocitos y neuronas), sembradas sobre cubreobjetos y previamente fijadas con paraformaldehído (PFA) (4%), se incuban con glicina (20 mM) durante 5 minutos y posteriormente con PBS pH 7,4 con Triton™ X-100 (0,1%) durante 5 minutos. Tras lavar con PBS, se siguen las instrucciones del Kit Duolink® (Sigma Aldrich), realizando todas las incubaciones en gota dentro de una cámara húmeda. Una vez realizado el PLA, se tiñen los núcleos celulares con Hoechst (1:500) en PBS pH 7,4 durante 5 minutos y tras lavar, se colocan sobre un portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia: Tris-HCl (100 mM) pH 8,5, Molwio[®] 4-88 (3,1 mM) y glicerol (25%). Finalmente, se adquiere la fluorescencia emitida con un microscopio confocal SP-5 (Leica) (Hoeschst Exc: 350 nm/ Em: 461 nm y PLA Exc: 594 nm/ Em: 624 nm).

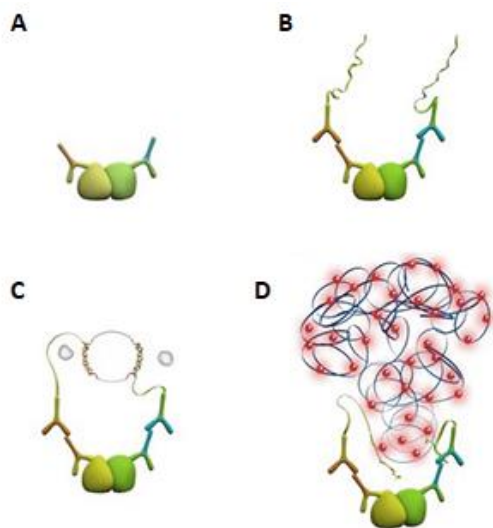


Figura 11. Esquema de las etapas de la técnica de PLA.

Se representa cómo dos proteínas interaccionando (amarillo y verde) son reconocidas por sus respectivos anticuerpos específicos (A) que a su vez serán reconocidos por anticuerpos secundarios acoplados a cadenas de oligonucleótidos (B) que, si se encuentran lo suficientemente próximas, serán ligados (C) y amplificados, hibridando con oligonucleótidos fluorescentes (puntos rojos) (D).

Modificado de la página web <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/how-pla-works.html>

3.3.6. Inmunohistoquímica

Se ha realizado inmunohistoquímica, sobre cortes de tejido lesionado por isquemia (Apartado 3.5.1). Para obtenerlos, el animal anestesiado con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) se perfunde intracardiamente con solución salina NaCl (0,9%), seguido de PFA (4%). Se disecciona el cerebro y tras permanecer 24 horas en PFA (4%) y lavarlo con PBS se corta (50 µm) con vibrátomo VT1000S (Leica), en el plano coronal. Para la inmunodetección de las proteínas, los cortes de tejido se incuban en flotación, con PBS pH 7,4, BSA (1%) y Tritón X-100 (1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incuban con el anticuerpo

primario frente a la proteína de interés (Tabla 5) diluido en la misma solución, durante 15 horas en agitación a 4 °C. Posteriormente, tras lavar, se incuba con un anti-IgG-Alexa® Fluor (Thermo Fisher Scientific) (1:1000) diluido en PBS durante 1 hora, correspondiente a la especie del hospedador en la que se haya generado el anticuerpo primario. Por último, se incuban con Hoechst (1:500) en PBS pH 7,4 durante 5 minutos y tras lavar, se colocan sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia y se adquieren las imágenes en un microscopio confocal SP-5.

Las imágenes obtenidas con el microscopio se han analizado con el software Image J.

ANTICUERPOS INMUNOHISTOQUÍMICA				
Proteína	Dilución de uso	Hospedador		Fabricante
ApoE	1:200	Cabra	Policlonal	Calbiochem
APP (22C11)	1:200	Ratón	Monoclonal	Millipore
GFAP	1:1.000	Ratón	Monoclonal	Millipore
NeuN	1:200	Conejo	Monoclonal	Cell Signaling

Tabla 5. Listado de anticuerpos empleados para Inmunohistoquímica

Se detallan los anticuerpos primarios empleados para incubar los cortes de tejido contra las proteínas de interés, así como la dilución de trabajo empleada y la especie del hospedador en la que han generado.

3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés, *polymerase chain reaction*) cuantitativa

Para el análisis de la expresión génica de los genes de interés, se extrae el ARN de las células empleando el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante que consiste en: añadir cloroformo en proporción 5:1 (TRIzol®:cloroformo) y obtención de la fase acuosa, precipitación con 2-propanol en proporción 2:1 (TRIzol®:2-propanol), lavado con etanol (75%) y resuspensión del ARN en agua libre de enzimas de degradación de ARN. Previa a la precipitación, sobre la fase acuosa, se añade enzima de degradación de ADN (Promega) (1 U/ml) y se sigue el protocolo recomendado por el fabricante, para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico de la muestra de ARN aislada. El ARN se cuantifica, registrando la absorbancia a 260 nm y se evalúa su pureza mediante la relación de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm, registrados con el equipo NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

A continuación, se realiza la retrotranscripción de 1 µg de ARN para obtener el ADNc empleando el Kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription*” (Applied Biosystem™, Thermo Fisher Scientific) que proporciona el tampón, nucleótidos, cebadores y retrotranscriptasa necesarios para llevar a cabo la reacción, y empleando un termociclador Mastercycler® (Eppendorf). Posteriormente, se diluye y se realiza la cuantificación mediante PCR en tiempo real, de los genes de interés presentes, empleando el Kit “*TaqMan™ universal PCR Master Mix*” y sondas de oligonucleótidos TaqMan® (Applied Biosystem™, Thermo Fisher Scientific) frente a apoE o APP de rata, en un termociclador 7500 (Life Technologies).

En cada muestra, se ha realizado de forma simultánea, la cuantificación del ARN ribosomal de la subunidad menor (ARNr 18S) cuyo valor se ha considerado como la cantidad total de ARN presente en la muestra, frente al que se ha relativizado la cantidad de ARN del gen de interés.

3.5. ESTUDIOS *IN VIVO*

Todos los ratones empleados se han estabulado en cubetas de 530 cm², con un máximo de 5 animales por cubeta, con acceso libre a comida y bebida, en condiciones controladas de humedad, temperatura (20 °C ± 2 °C) y luz (ciclo de 12 horas luz/oscuridad, empezando a las 7:30 a.m.). Se han seguido las normas Europeas de Bienestar Animal (2010/63/UE y 2003/65/CE) y todos los procedimientos han sido previamente aprobados por el Comité de Ética de Experimentación animal de la Comunidad de Madrid siguiendo el RD 53/2013.

3.5.1. Modelo de isquemia cerebral hemorrágica

Se han empleado ratones transgénicos macho que expresan el IGF-IR truncado en astrocitos, bajo la administración de tamoxifeno (Sigma Aldrich), llamado FIRKO-T, que se ha generado a partir del cruce de dos ratones modificados genéticamente (Hirrlinger et al., 2006) (Fig. 12). Uno de ellos, expresa el gen de la recombinasa Cre regulado por el promotor transcripcional de GFAP, e inducible por tamoxifeno (CreER^{T2}). De manera que, recombinasa Cre (inactiva) se expresa en las células mientras expresen GFAP, que en la edad adulta es principalmente en astrocitos. En presencia de tamoxifeno, Cre recombinasa (activa) se transloca al núcleo donde va a mediar la eliminación por recombinación de una secuencia flanqueada por LoxP. Este animal, se ha cruzado con otro ratón, que tiene flanqueada con secuencias LoxP la región de 120 pb que codifica para el exón 3 del IGF-IR. Por tanto, en el animal FIRKO-T, tras la administración de tamoxifeno, las células GFAP+ expresan una forma truncada del IGF-IR, que no responde a la unión de su ligando.

Cuando los ratones FIRKO-T cumplieron 8 semanas de edad, se administró tamoxifeno (80 mg/kg) (Sigma Aldrich) (n=3) o vehículo (aceite de maíz, Sigma Aldrich) (n=3) por vía intraperitoneal, durante 5 días consecutivos.

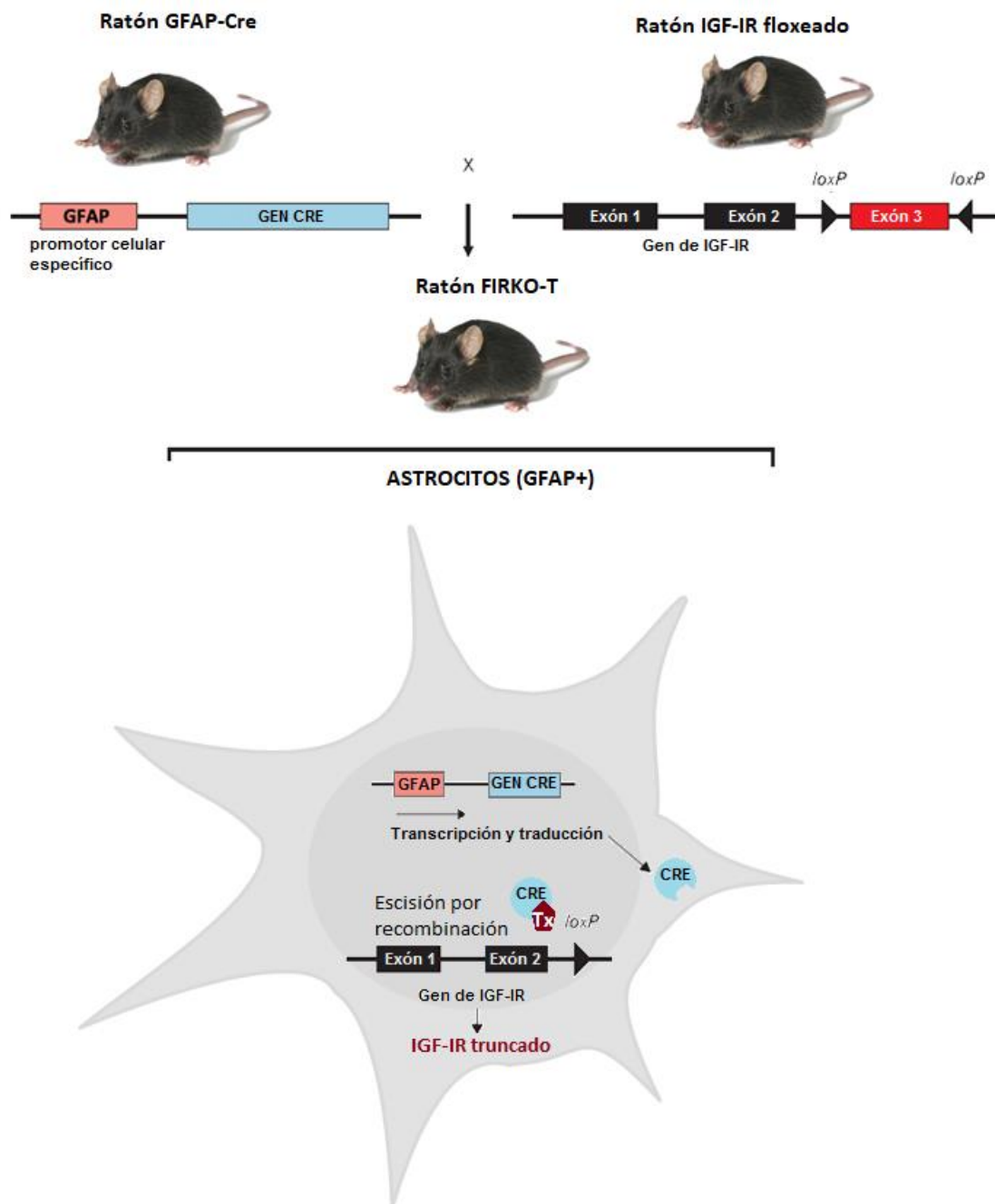


Figura 12. Esquema de la generación del ratón transgénico FIRKO-T.

Se muestra el cruce de dos ratones modificados genéticamente donde, a través de la actividad recombinasa de Cre, inducida por tamoxifeno (Tx), se genera una proteína truncada del IGF-IR en los astrocitos del animal FIRKO-T resultante de este cruce. Modificado de Chai et al., 2013.

Trascurrido un mes tras la inyección de tamoxifeno, se procede a realizar la cirugía para generar una isquemia de tipo hemorrágico en el hemisferio derecho (modificado de Pozo-Rodrigálvarez et al., 2012). Para ello, bajo anestesia inhalatoria (Isoflurano, Abbott), se realiza una craneotomía exponiendo la arteria cerebral media y se secciona su rama común, se drena la hemorragia producida y se sutura al animal. Transcurridos 7 días post-isquemia, se perfunde al animal intracardiamente, se obtiene el cerebro y se procesa según se describe en el apartado 3.3.6 para analizar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de las proteínas APP y NeuN (marcador neuronal) o apoE, NeuN y GFAP (marcador astrocitario) (Tabla 5, inferior).

A. Tinción histológica de la región lesionada

En los primeros animales lesionados, se comprobó la correcta realización de la cirugía mediante la visualización de la zona isquémica por tinción histológica. Para ello, los animales en el día 7 post-isquemia se sacrifican por dislocación cervical, se extrae el cerebro en frío, se corta (1 mm) en el plano coronal con un molde (Roboz Surgical Instrument) y se incuba en oscuridad con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC, del inglés *2,3,5-TriphenylTetrazolium Chloride*) (1%) en PBS pH 7,4. Este método de tinción, está fundamentado en el mismo principio que el ensayo de viabilidad celular (Apartado 3.3.1), visualizando la coloración del tejido metabólicamente activo por la formación del producto reducido formazán, mientras que la región lesionada en la que no hay actividad celular permanece sin colorear (Anexo II).

3.5.2. Modelo de dieta con alto contenido en grasa

Para generar un modelo animal con elevados niveles de apoE y que simulen los síntomas metabólicos generados por la obesidad, se sometió a un grupo de ratones macho C57BL/6 (Envigo), de 8 semanas de edad, a una dieta con alto contenido en grasa (45% kJ de grasa) y 1,25% de colesterol (Ssniff) (n=20), o dieta control (10% KJ de grasa) (n=20), durante 10 semanas, con libre acceso a la comida y bebida (Fig. 13). En el momento de comienzo con la dieta (basal), y semanalmente, se registra el peso corporal de los animales. Además, en la semana 9 desde el comienzo de la dieta, se realiza un test metabólico de tolerancia a glucosa (A) y al finalizar la dieta, se aplica un protocolo de enriquecimiento ambiental (B) durante 2 horas y se procede al sacrificio de los animales, a los que se les extrae sangre por punción intracardiaca y se disecciona el cerebro. Un grupo de animales (n=4) de cada tipo de dieta se han empleado para evaluar el metabolismo periférico de A β 40 (C).

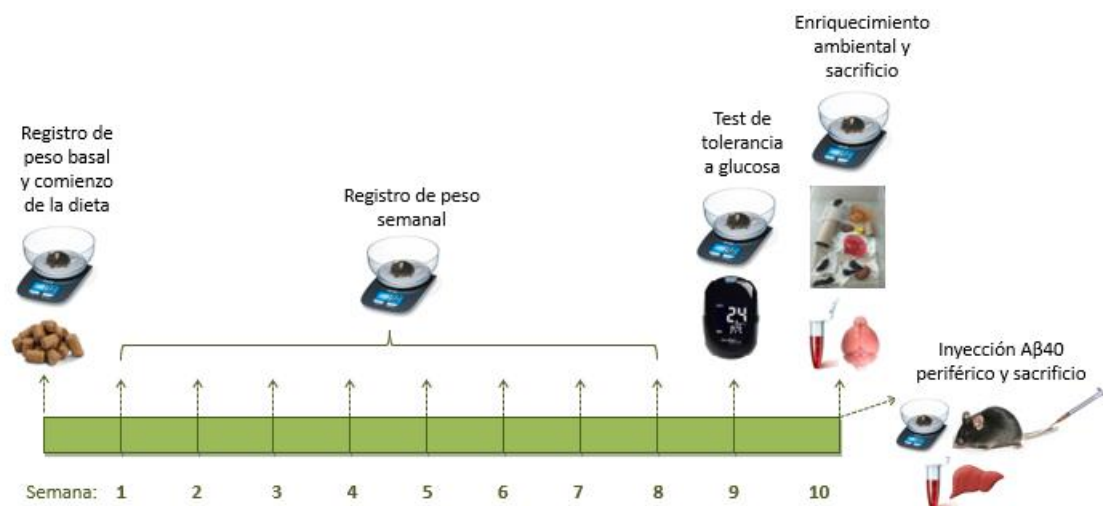


Figura 13. Esquema del cronograma seguido en la experimentación con los animales sometidos a dieta con alto contenido en grasa.

Se muestra la secuencia temporal de los procedimientos realizados con animales obesos, generados mediante la alimentación con una dieta de alto contenido en grasa, y los alimentados con dieta control, durante 10 semanas.

A. Test metabólico de tolerancia a glucosa

Para evaluar si los animales sometidos a la dieta con alto contenido en grasa desarrollan alteraciones metabólicas, se les realiza una prueba de tolerancia a glucosa. Para ello, se mantiene a los animales en ayuno de comida durante 4 horas e individualizados, y se les mide la glucosa sanguínea con un glucómetro y tiras reactivas (GlucoMen® areo), tomando una muestra de sangre de la punta de la cola (basal). Seguidamente, se induce una hiperglucemia inyectando una solución de glucosa (2 g/Kg) por vía intraperitoneal y se mide la glucosa sanguínea transcurridos 15, 30, 60 y 90 minutos, en una muestra aleatoria de animales (n=8) de cada tipo de dieta.

B. Enriquecimiento ambiental

Para favorecer la entrada de IGF-I al cerebro, la mitad de los animales alimentados con cada tipo de dieta (n=10), fueron sometidos a un protocolo agudo de enriquecimiento ambiental durante 2 horas (Trueba-Saiz et al., 2017). Consiste en exponer a los animales a una mayor interacción social, al encontrarse 10 animales por cubeta (machos y hembras), y permitirles la exploración de objetos, túneles, red de trepar y discos de ejercicio voluntario, en una cubeta de mayores dimensiones (1815 cm²) (Fig. 14). Mientras tanto, los animales control (n=10) permanecen el mismo tiempo en sus cubetas de estabulación. Transcurridas

las 2 horas, se sacrifica a todos los animales, tomando muestras de sangre y diseccionando el cerebro de cada animal.

Las muestras de sangre fueron procesadas para obtener el suero. Para ello, tras permanecer 4 horas a temperatura ambiente, se centrifugan durante 10 minutos a 2000 x g y se recoge el sobrenadante.



Figura 14. Fotografía de una cubeta de enriquecimiento ambiental.

Se muestra una cubeta de enriquecimiento ambiental donde los animales se encuentran libremente explorando objetos, túneles, red para trepar y ruedas de ejercicio voluntario.

C. Aclaramiento periférico de A β 40

Se ha evaluado la degradación hepática de A β 40 en animales sometidos a la dieta con alto contenido en grasa o dieta control (n=4). Para ello, se inyecta A β 40 fluorescente (A β 40-HiLyte Fluor™ 488) (400 μ g/Kg), a nivel periférico, mediante la canulación (0,38 mm, Intramedic™) de la vena lateral de la cola. Transcurridos 90 minutos, se sacrifica a los animales, se toma una muestra de sangre intracardiaca y se disecciona el hígado. La sangre se ha procesado para obtener el suero y de la muestra de hígado se ha extraído la proteína homogeneizando en el tampón de lisis descrito en el apartado 3.2.2. Finalmente, se cuantifica la fluorescencia presente en el extracto proteico, así como en la muestra de suero, con el equipo FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech) (Exc: 485 nm/Em: 520 nm). Además, con el extracto proteico procedente del hígado, se ha realizado una determinación de proteína empleando el kit BCA (del inglés *Bicinchoninic Acid*) (Sigma Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante, para relativizar los valores de A β 40 presentes respecto a la proteína total del extracto obtenido.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos, los valores obtenidos han sido relativizados respecto a los valores basales y en los ensayos en los que se han realizado mediciones replicadas, además se ha calculado el promedio entre los replicados. Se expresa el resultado del promedio de los valores relativos obtenidos en cada ensayo independiente (media \pm error típico) en unidades arbitrarias (UA).

Los datos se han analizado estadísticamente con el software GraphPad Prism 6.0, comprobando la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad mediante la prueba de Barlett. Tras ello, se emplea la prueba T de Student para la comparación de dos grupos, o ANOVA (del inglés, *Analysis of Variance*) para la comparación de más de dos grupos con un análisis post-hoc de Bonferroni. Se ha considerado una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

4

Resultados



4.1. EFECTO DE APOE Y A β 40 SOBRE LA ENTRADA DE IGF-I A TRAVÉS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA *IN VITRO*

Gran parte del IGF-I presente en el cerebro procede de la periferia, por lo que la regulación de los mecanismos de entrada de IGF-I podría repercutir directamente sobre las funciones que desempeña a nivel central. En este proceso intervienen el IGF-IR y el receptor de lipoproteínas LRP1, y son las células endoteliales de los vasos sanguíneos y las células epiteliales del plexo coroideo, las principales transportadoras de IGF-I al interior del cerebro, desde la sangre y CSF, respectivamente (Fernandez and Torres-Alemán, 2012). Por ello, se pretende estudiar sobre estos dos tipos celulares, si las isoformas humanas apoE2 y apoE4, modifican la internalización de IGF-I, y a nivel del endotelio vascular, su transporte por transcitosis. Por otra parte, resultados ya publicados por el laboratorio, han revelado que el A β 40 soluble inhibe la internalización de IGF-I por las células endoteliales, dependiente de la dosis (Trueba-Sáiz et al., 2013), por lo que también se pretende evaluar si las isoformas de apoE modulan este efecto inhibitorio del A β 40 soluble sobre la internalización de IGF-I por este tipo celular, e incluyendo en el estudio a las células del plexo coroideo.

4.1.1. Efecto de las isoformas humanas de apoE sobre la internalización de IGF-I por células endoteliales y de plexo coroideo *in vitro*

Inicialmente, para evaluar el efecto de las isoformas humanas apoE2 y apoE4 sobre la internalización de IGF-I por las células que forman parte de la barrera hematoencefálica, se trataron cultivos primarios de endotelio y plexo coroideo de rata, con las isoformas humanas de apoE, previamente lipidadas con DMPC, así como con el lípido DMPC libre como control, y se analizó mediante Western blot el bhIGF-I internalizado durante una hora. Los resultados muestran que en las células endoteliales se produce una inhibición sobre la internalización de IGF-I con ambas isoformas de apoE (Fig. 15A), siendo estadísticamente significativa el efecto de apoE4-DMPC (*p=0,0163). Además, el lípido DMPC ejerce un fuerte efecto inhibitorio (**p=0,0002) que es mayor respecto a cuando se encuentra asociado a apoE2 (#p=0,0189). Por ello, para descartar que la acción mostrada por apoE-DMPC sobre la captura de IGF-I pudiera ser un efecto enmascarado de la fracción de lípido que queda libre en la solución apoE-DMPC con la que se han tratado las células, se han realizado estos mismos experimentos con las isoformas de apoE recombinante sin lipidar (Anexo I) donde se observa el mismo efecto, demostrándose que la propia apoE, tiene un efecto inhibitorio sobre la internalización de IGF-I.

En el caso de las células del plexo coroideo, aunque se observa también una inhibición de la internalización de IGF-I cuando apoE está presente e independiente de la isoforma (Fig. 15B), esta diferencia no es estadísticamente significativa respecto a la internalización en condiciones basales.

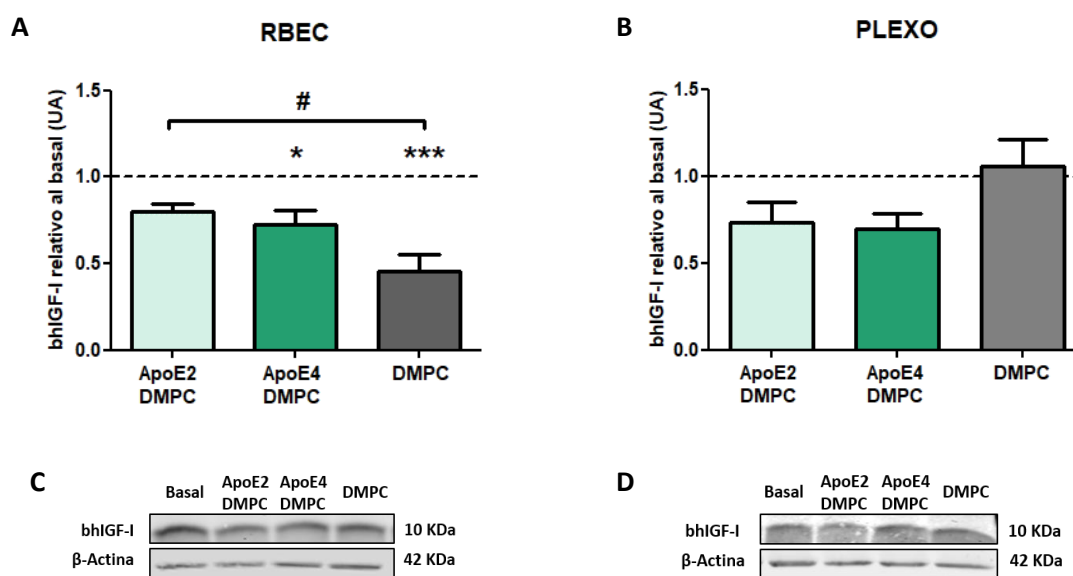


Figura 15. ApoE modula la internalización de IGF-I por células de endotelio

Cuantificación de bhIGF-I internalizado por células endoteliales (RBEC) (A) y de plexo coroideo (B) tras el tratamiento con las isoformas apoE2 y apoE4 previamente lipidadas con DMPC. Se ha analizado por Western blot y relativizado respecto a su nivel basal (línea discontinua) en cada caso, considerando la β -actina como cantidad de proteína total. Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=6 y grupo DMPC n=3, por triplicado. ANOVA de una vía; post-hoc Bonferroni: *p-valor<0,05 y ***p-valor<0,001 vs basal; #p-valor<0,05 ApoE2-DMPC vs DMPC. Se muestra la imagen de Western blot representativa para las células endoteliales (C) y para las células de plexo coroideo (D).

4.1.2. Efecto de las isoformas humanas de apoE sobre la modulación por A β de la internalización de IGF-I por células endoteliales y de plexo coroideo *in vitro*

A continuación, se analizó si las diferentes isoformas humanas de apoE modulan el efecto del A β 40 soluble sobre la internalización de bhIGF-I, en los mismos tipos celulares analizados anteriormente. Como se había establecido previamente (Trueba-Sáiz et al., 2013), A β 40 soluble inhibe la internalización de IGF-I por células del endotelio (**p=0,0042) (Fig. 16A), pero no en células del plexo coroideo (Fig. 16B).

En cuanto a la implicación de apoE, como se muestra en la figura 16A, se pierde el efecto de A β 40 en el endotelio cuando está presente apoE dependiendo de la isoforma, ya que las células endoteliales internalizan cantidades de IGF-I similares a la condición basal si apoE2-DMPC se encuentra junto con el A β 40, siendo significativamente mayores ($^{\#}p<0,0177$) que bajo el efecto de A β 40 solo. Este restablecimiento de los valores de internalización de IGF-I, no se observa con la isoforma apoE4-DMPC.

Por su parte, en las células del plexo coroideo (Fig. 16B), A β 40 no inhibe la internalización de IGF-I como ocurre en el endotelio, y parece que hay una tendencia a la inhibición sobre A β 40 por apoE sin depender de la isoforma, pero no se observan diferencias estadísticamente significativas.

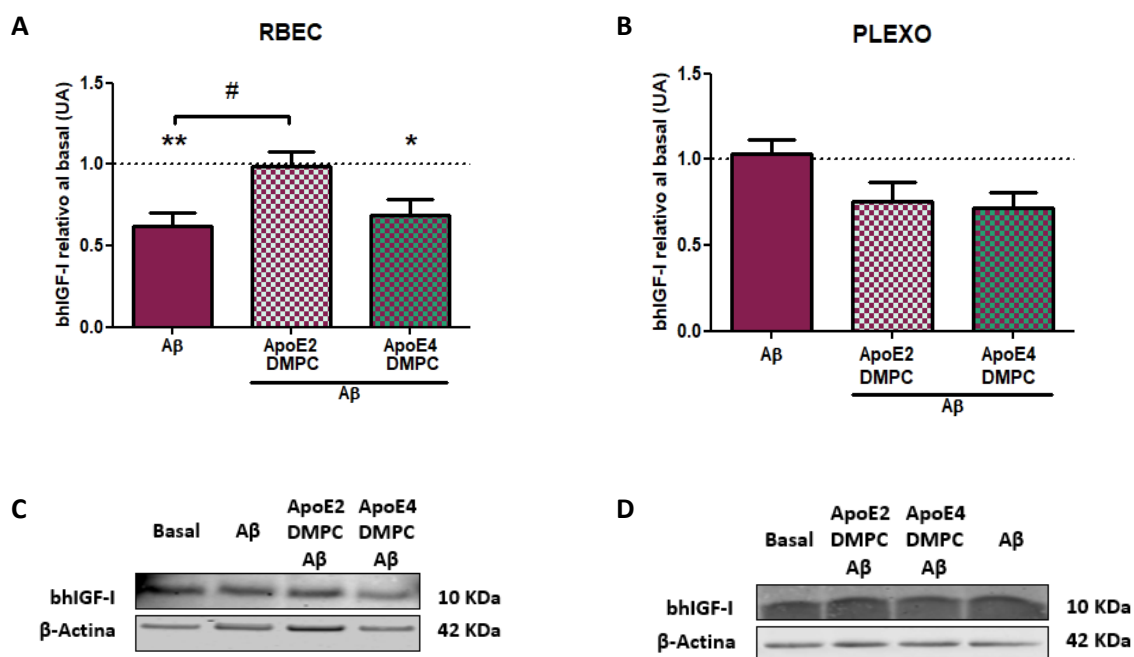


Figura 16. ApoE modula de manera isoforma-dependiente el efecto de A β 40 sobre la internalización de IGF-I en células de endotelio, pero no en las de plexo.

Cuantificación de bhIGF-I internalizado por las células endoteliales (A) y plexo coroideo (B) tras el tratamiento con A β 40 soluble y las isoformas apoE2 y apoE4 previamente lipidadas con DMPC. Se han analizado por Western blot y relativizado respecto a su nivel basal (línea discontinua), en cada caso. Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=5 por triplicado. ANOVA de una vía; post-hoc Bonferroni: **p-valor= 0,01 vs basal; $^{\#}$ p-valor=0,0177 A β vs A β +ApoE2-DMPC. Se muestran las imágenes de Western blot representativos (C y D) de los histogramas representados en A y B, respectivamente.

4.1.3. Efecto de las isoformas humanas de apoE sobre la transcitosis de IGF-I por células endoteliales *in vitro*

El IGF-I que es internalizado por las células, puede tener diferentes destinos como intervenir en rutas de señalización y degradación, o bien ser transportado a través de la célula mediante transcitosis para ser secretado de nuevo. Por ello, ahora se pretende evaluar si el transporte de IGF-I, por células endoteliales, se ve modificado por apoE. Se ha empleado un sistema *in vitro*, que permite crear dos compartimentos diferenciados y delimitados por una monocapa sellada de células endoteliales de rata, produciéndose el paso selectivo de sustancias mediante el transporte celular entre ambos compartimentos. Se ha comenzado comprobando la permeabilidad de la barrera creada, evaluando el paso de dextrano de 70 KDa y la generación de la resistencia transendotelial (TEER). Cuando se forma la monocapa sellada de células, se observa una marcada reducción del paso de dextrano ($***p<0,001$) (Fig. 17A) junto con un gran incremento de la TEER ($**p=0,0027$) (Fig. 17B).

Una vez validadas las propiedades de barrera del sistema, se realizó el tratamiento con bhIGF-I en el interior del inserto en presencia de las isoformas humanas de apoE previamente lipidadas con DMPC y se cuantificó mediante Western blot el bhIGF-I presente en el compartimento inferior que ha sido transportado. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17C, donde no se observan diferencias estadísticamente significativas en ningún caso, aunque parece que la isoforma apoE2 tiene efectos opuestos a la isoforma apoE4.

En conjunto, los resultados hasta el momento indican que apoE interfiere con la entrada de IGF-I en las células que forman parte de la BBB de manera selectiva, siendo más susceptibles las células endoteliales. En este tipo celular, tras el tratamiento con apoE se observa menor cantidad de IGF-I en el interior celular, más acusado con la isoforma apoE4 que apoE2, pero sin modificarse significativamente su transporte. Además, cuando apoE se encuentra junto con A β 40 soluble, sólo la isoforma apoE2 es capaz de anular el efecto inhibitorio que tiene A β 40 sobre la internalización de IGF-I.

A la vista de estos resultados, los experimentos *in vitro* han aportado datos sugerentes sobre una posible implicación de apoE en lo referente a la internalización de IGF-I por las células endoteliales, pero no se ha podido establecer si esto se traduce en que apoE podría promover que se produzca una menor llegada de IGF-I al interior del cerebro. Para tratar de averiguarlo, se ha realizado la evaluación *in vivo* del transporte de IGF-I en presencia de apoE, con un modelo animal de ratones con sobrepeso.

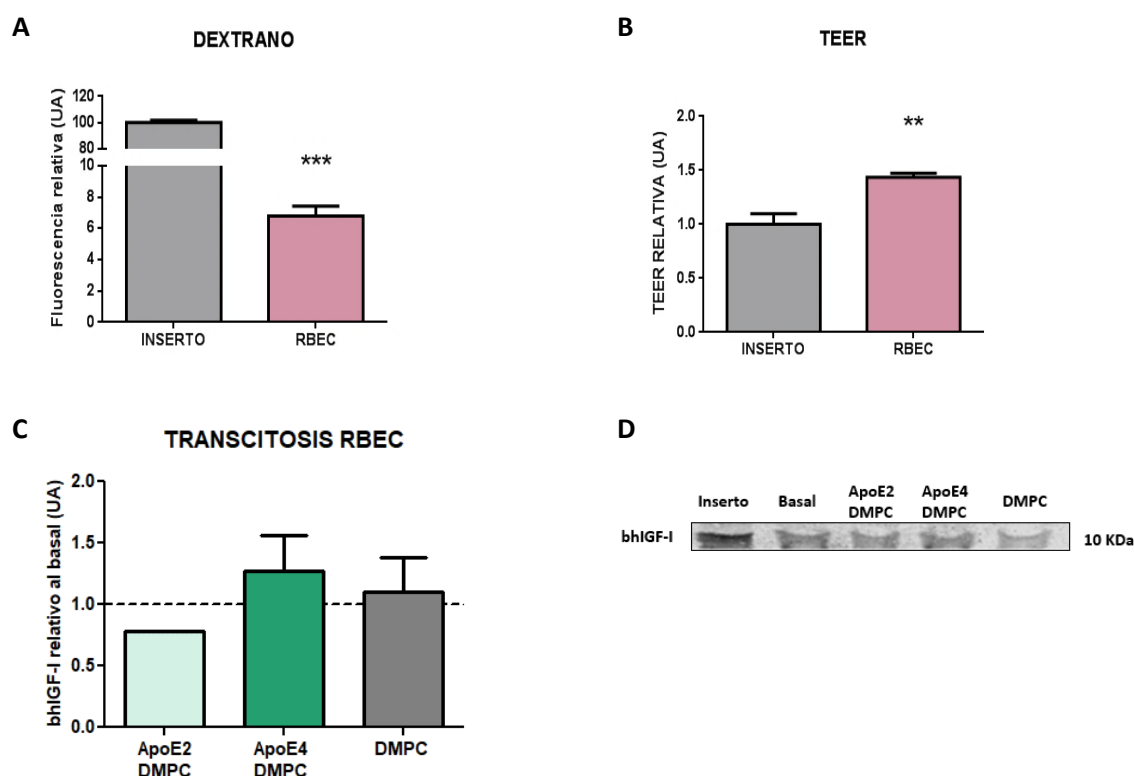


Figura 17. ApoE no modifica el transporte de IGF-I por células endoteliales *in vitro*.

Se muestra la cuantificación de la fluorescencia emitida por el dextrano-FITC (A) y la resistencia transendotelial registrada (B) en ausencia (inserto) o presencia de células endoteliales (RBEC), relativizado respecto al inserto solo, n=6, por triplicado. T-test: ***p-valor<0,001, **p-valor<0,01 vs inserto. También se muestra la cuantificación correspondiente al bhIGF-I transportado tras el tratamiento con las isoformas apoE2 y apoE4 previamente lipidadas con DMPC (C) analizado por Western blot, cuya imagen representativa se muestra en (D), n=4, por triplicado. ANOVA de una vía. Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico.

4.2 EFECTO DE APOE SOBRE LA ENTRADA DE IGF-I AL CEREBRO EN UN MODELO *IN VIVO* DE RATÓN

El estilo de vida y tipo de dieta consumida repercute sobre los niveles de IGF-I e insulina circulantes. Se ha asociado el consumo de dietas poco saludables con alto contenido en grasa, junto con el sedentarismo, con un aumento del riesgo a padecer obesidad y DMII, desarrollando un síndrome metabólico con una marcada resistencia a insulina que supone un factor de riesgo en el desarrollo de la EA. Además, las dietas con elevado contenido en grasa elevan los niveles de apoE plasmáticos, proporcionando un modelo para el estudio del papel que tiene la apoE circulante. Si bien apoE no atraviesa directamente la barrera hematoencefálica, dependiendo de los niveles de apoE en sangre, se podría ver modificada la entrada de IGF-I al interior del cerebro a través de las células endoteliales, como apuntan las observaciones *in vitro*.

4.2.1 Alteraciones metabólicas desarrolladas por los ratones sometidos a dieta con alto contenido en grasa

Para generar el modelo animal se ha sustituido la dieta estándar a los ratones por una dieta con alto contenido en grasa, durante 10 semanas. El efecto de la dieta produce que los ratones aumenten un 70% su peso corporal respecto al inicio de la dieta (Fig. 18A) y este incremento es mayor ($***p<0,0001$) que el experimentado por los animales alimentados con la dieta control, en los cuales supone un 50% más, respecto a su peso basal.

Para comprobar si el sobrepeso va asociado al desarrollo de alteraciones metabólicas, transcurridas 9 semanas desde el inicio de la dieta, cuando la diferencia de ganancia de peso entre los grupos experimentales ya es evidente ($**p<0,001$), se evaluó su estado metabólico mediante una prueba de tolerancia a glucosa (Fig. 18B). Los resultados muestran que, tras generar una hiperglucemia, por una inyección intraperitoneal de una elevada dosis de glucosa, los animales con sobrepeso mantienen significativamente más elevados los niveles de glucosa sanguíneos, en todos los puntos temporales medidos, respecto a los animales controles cuya glucemia, con el transcurso del tiempo, va retornando a niveles basales. Por tanto, se confirma que los animales con mayor incremento de peso desarrollan intolerancia a la glucosa.

Finalmente, se comprobó el impacto de la dieta sobre los niveles plasmáticos de apoE e IGF-I medidos mediante ELISA, confirmándose que los animales con sobrepeso triplican los niveles de apoE en suero respecto a los animales de dieta control ($***p<0,001$) (Fig. 18C) y presentan elevados los niveles de IGF-I ($***p<0,001$) (Fig. 18D).

Por tanto, tras la alimentación durante 10 semanas con una dieta con alto contenido en grasa se genera sobrepeso en los ratones, asociado al desarrollo de alteraciones metabólicas, previsiblemente acompañada de resistencia a insulina/IGF-I y que, por sus altos niveles periféricos de apoE, pueden emplearse para estudiar el papel que ejerce esta lipoproteína en su interacción con el sistema IGF-I, por lo que se pasó a abordar nuestro objetivo, estudiando la entrada de IGF-I al cerebro de estos animales.

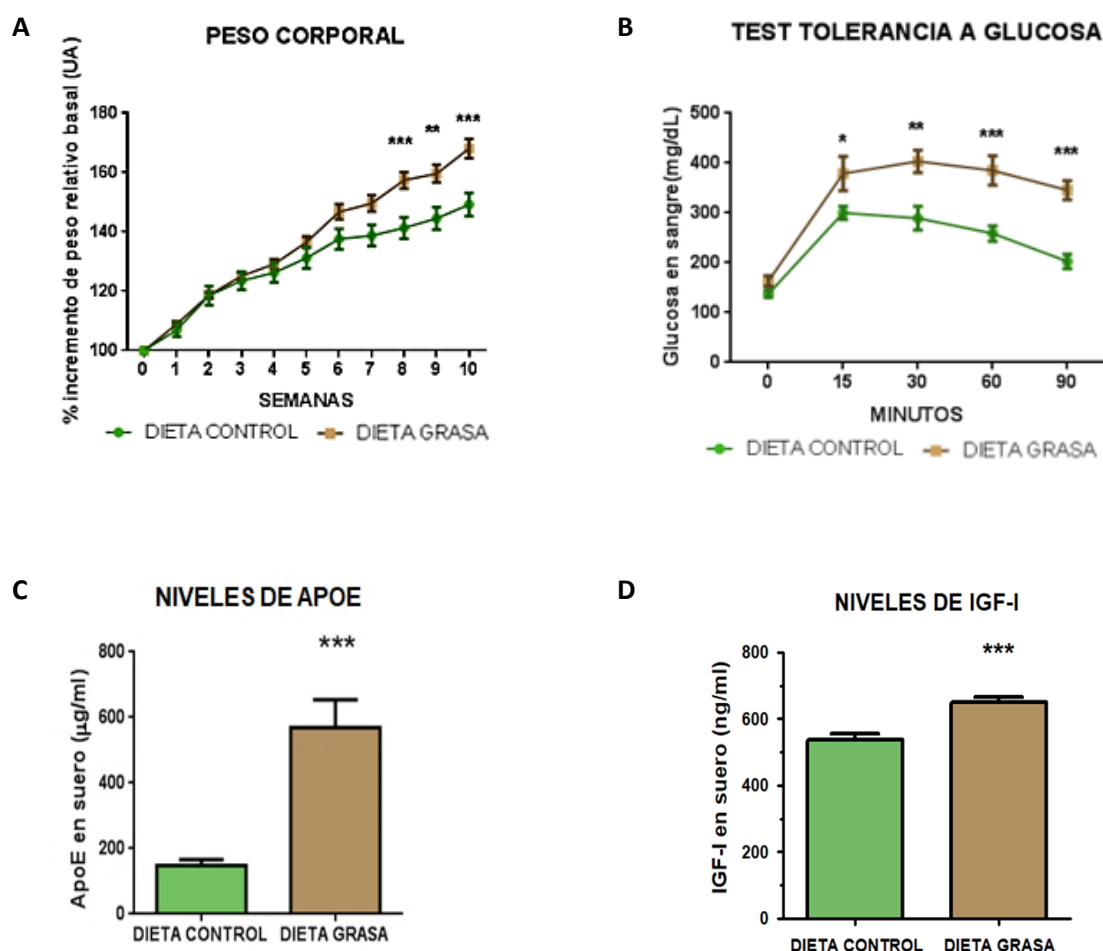


Figura 18. Los ratones sometidos a una dieta rica en grasa desarrollan sobrepeso, intolerancia a la glucosa y presentan elevados niveles plasmáticos de IGF-I y apoE.

Se muestra el incremento de peso (%) semanalmente, respecto al peso basal al inicio de la dieta, de los animales alimentados con una dieta control (verde) o con una dieta con alto contenido en grasa (marrón) (A) y los niveles de glucosa sanguínea (mg/dl) transcurridos 15, 30, 60 y 90 minutos tras generar una hiperglucemia (B). N=20. ANOVA de 2 vías de medidas repetidas, post-hoc Bonferroni: *p-valor<0,05, **p-valor<0,01 y ***p-valor<0,001 vs dieta control.

Se muestran los niveles de apoE plasmáticos (µg/ml) (C) y de IGF-I (ng/ml) (D) medidos mediante ELISA en ratones alimentados con dieta control y dieta con alto contenido en grasa. Media ± error típico. N=10, T-Test: ***p-valor<0,001 vs dieta control.

4.2.2. Efecto de la dieta con alto contenido en grasa sobre la entrada de IGF-I al cerebro tras enriquecimiento ambiental

La entrada de IGF-I al interior del cerebro se ve estimulada ante situaciones tales como el ejercicio físico voluntario y el enriquecimiento ambiental. Se ha escogido este último procedimiento como aproximación experimental para activar dicho mecanismo, y tras someter a los animales control y con sobrepeso a un protocolo de enriquecimiento ambiental de 2 horas, se ha detectado mediante Western blot la fosforilación en Tyr del IGF-IR inmunoprecipitado en el hipocampo. El estado de fosforilación del IGF-IR se ha empleado

como medida de activación tras la unión de su ligando y de esta forma indirecta, como medida de la entrada de IGF-I al cerebro. Ya que, cuando produce una mayor activación del IGF-IR en este paradigma, se debe a una entrada de IGF-I al cerebro procedente de la periferia, como hemos demostrado en trabajos anteriores (Trueba-Saiz et al., 2017).

Los resultados se muestran en la figura 19, donde se observa que sólo en los animales alimentados con la dieta control se encuentra más fosforilado el IGF-IR hipocampal, tras el enriquecimiento ambiental. Aunque parece que en condiciones basales, los animales con sobrepeso presentan un ligero aumento en la fosforilación del IGF-IR, tras estimular la entrada de IGF-I mediante enriquecimiento ambiental, no se produce un incremento en la activación del IGF-IR en estos animales, incluso pese a tener elevados los niveles de IGF-I periféricos existiendo mayor disponibilidad para su entrada al cerebro. Por tanto, la dieta con alto contenido en grasa parece interferir con la entrada de IGF-I desde la periferia al cerebro y este efecto inhibitorio podría estar mediado por apoE, muy incrementada en estos animales.

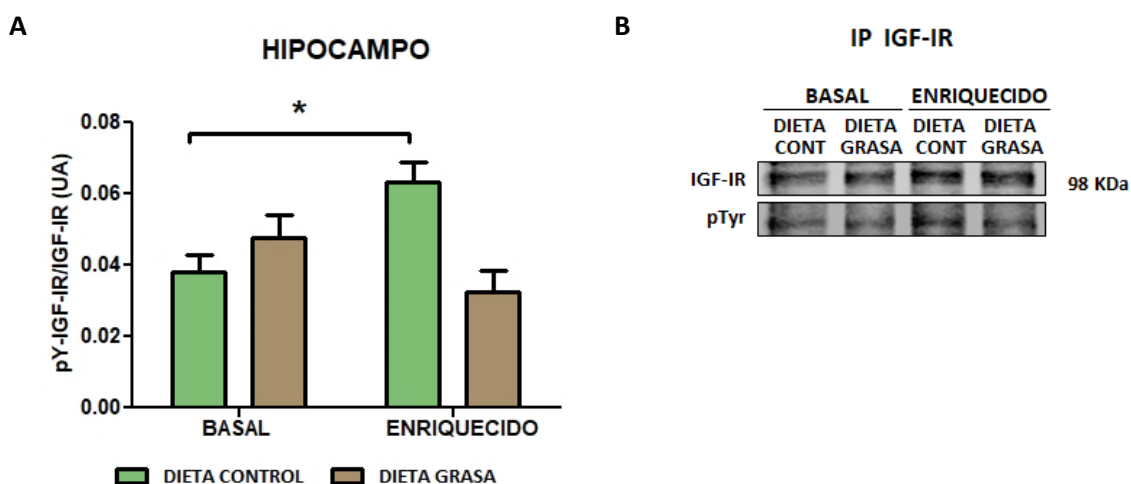


Figura 19. La dieta con alto contenido en grasa impide la fosforilación del IGF-IR hipocampal tras la estimulación con enriquecimiento ambiental.

Cuantificación de la fosforilación en Tyr del IGF-IR respecto al IGF-IR total inmunoprecipitado de animales con dieta control (verde) o dieta con alto contenido en grasa (marrón) tras enriquecimiento ambiental de 2 horas (**A**). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=10. ANOVA de dos vías; post-hoc Bonferroni: *p-valor<0,05. Se muestra la imagen de Western blot representativa (**B**).

A continuación, para conocer a nivel celular posibles mecanismos que se encuentren modificados y puedan explicar el efecto de apoE sobre la entrada de IGF-I al cerebro, se trató de averiguar, mediante ensayos *in vitro*, la modulación por apoE y el propio IGF-I sobre la interacción entre LRP1 e IGF-IR a nivel de las células endoteliales. El interés en abordar este objetivo reside en que ambos receptores están ampliamente expresados en células endoteliales, donde además se pueden encontrar interaccionando. Resultados previos del laboratorio muestran que la presencia de LRP1 favorece la internalización de IGF-I por células endoteliales, ya que, cuando la expresión de este receptor es regulada a la baja mediante RNA interferente, también se produce una disminución en la internalización de IGF-I (Nishijima et al., 2010).

4.3. MODULACIÓN POR IGF-I Y APOE SOBRE LA INTERACCIÓN ENTRE IGF-IR Y LRP1

El receptor LRP1 es uno de los receptores de lipoproteínas más ampliamente estudiado. Se trata de un receptor endocítico y se ha visto que puede unir diversos tipos de sustancias por las que tiene afinidad, y además puede interaccionar físicamente con otras proteínas de membrana, como el IGF-IR (Nishijima et al., 2010). Para estudiar la implicación de IGF-I y apoE sobre esta interacción, se han tratado las células de endotelio con IGF-I, apoE2-DMPC, apoE4-DMPC y la combinación de IGF-I con cada una de las isoformas de apoE-DMPC, y se ha inmunoprecipitado el LRP1, cuantificando mediante Western blot el IGF-IR que co-inmunoprecipita asociado al LRP1.

Se ha encontrado que no hay diferencias estadísticamente significativas (Fig. 20), observándose tan solo cierta tendencia a que cada isoforma ejerce efectos opuestos.

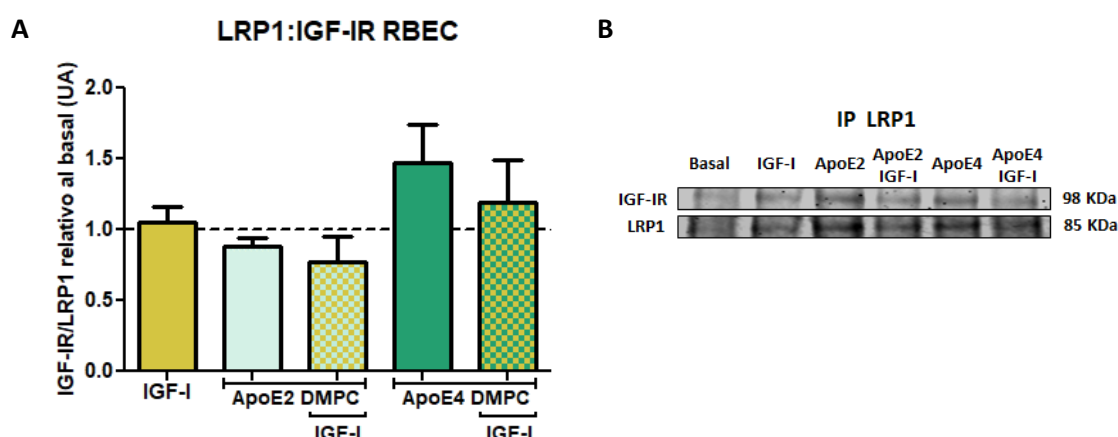


Figura 20. Efecto de IGF-I y apoE sobre la interacción entre IGF-IR y LRP1.

Cuantificación del IGF-IR respecto del LRP1 inmunoprecipitado en células endoteliales (A), tras el tratamiento con IGF-I y las isoformas apoE2 o apoE4, previamente lipidadas con DMPC. Se han analizado por Western blot el LRP1 inmunoprecipitado y el IGF-IR asociado (B). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=4. ANOVA de una vía.

La acción de apoE sobre la entrada de IGF-I al cerebro, podría mediar por la modificación en la biodisponibilidad y/o funcionalidad del IGF-IR, como consecuencia de las interacciones con otras proteínas y sobre las que apoE influya. Del mismo modo, no solo en lo referente al transporte de IGF-I, apoE podría repercutir sobre las funciones celulares que desempeña el IGF-I. Con el fin de averiguar si esto ocurre, a continuación, pasamos a estudiar una de las principales funciones fisiológicas de IGF-I, como es la supervivencia celular, y sus vías de señalización intracelulares, en presencia de apoE.

4.4. EFECTO DE APOE E IGF-I SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

El IGF-I ejerce un papel fundamental promoviendo la proliferación y supervivencia celular. Por ello, se decidió estudiar el impacto que tiene la interferencia de apoE sobre IGF-I en la viabilidad de las células estudiadas hasta el momento: el endotelio y plexo coroideo. Asimismo, se han incluido los astrocitos, ya que son un tipo celular muy importante en el cerebro con un gran impacto en la fisiología del SNC. Como medida de la viabilidad celular, se ha empleado el ensayo de MTS a dos tiempos diferentes: 24 y 48 horas, en condiciones de ayuno. Esta privación de nutrientes al que son sometidas las células, durante un periodo prolongado de tiempo produce un deterioro progresivo que conlleva la pérdida de la supervivencia y que es rescatada en presencia de IGF-I en todos los tipos celulares analizados, como se muestra en la figura 21. El efecto de IGF-I favoreciendo la viabilidad celular es estadísticamente significativo en el caso de las células endoteliales a las 48 horas (** $p < 0,01$) (Fig. 21A), pero en el caso de las células epiteliales de plexo coroideo (* $p < 0,05$) y astrocitos (** $p < 0,01$) ya es observable en las primeras 24 horas (Fig. 21B y C, respectivamente).

La combinación de IGF-I y apoE hace que se mantenga el efecto protector de IGF-I independientemente de la isoforma. No obstante, hay que destacar que, cuando apoE2 coexiste con IGF-I se observa un incremento de la viabilidad mayor al propio efecto de IGF-I, que no sucede en combinación con apoE4, llegando a ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las células endoteliales a las 48 horas (Fig. 21A). Observación que también se refleja a las 48 horas en células del plexo coroideo y astrocitos, aunque aquí la diferencia no es estadísticamente significativa.

Estos resultados evidencian que IGF-I favorece la viabilidad celular en todos los tipos celulares estudiados cuyo efecto, con el paso del tiempo, se ve potenciado al menos en células endoteliales, cuando se encuentra en combinación con apoE2, pero no con apoE4.

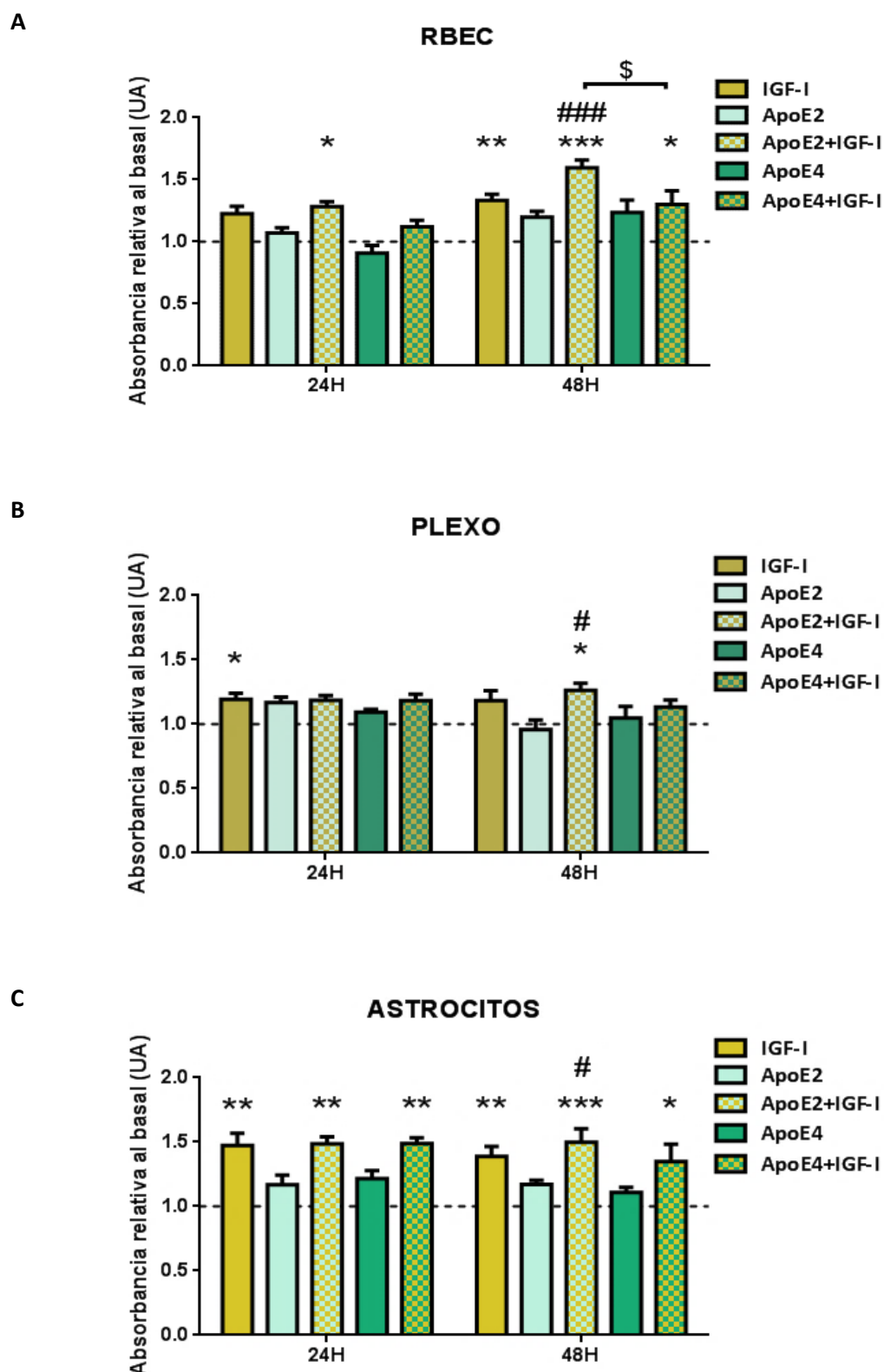


Figura 21. Viabilidad celular inducida por IGF-I y su modulación por apoE2 y apoE4, durante 24 y 48 horas.

Histogramas de la absorbancia tras el ensayo de MTS en células endoteliales (A) de plexo coroideo (B) y astrocitos (C) tras 24 y 48 horas de tratamiento con IGF-I y las isoformas apoE2 o apoE4. Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=6, por triplicado. ANOVA de dos vías, post-hoc Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs basal; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ apoE2+IGF-I vs apoE2; \$ $p < 0,05$ apoE2+IGF-I vs apoE4+IGF-I.

4.5. EFECTO DE APOE EN LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE IGF-I *IN VITRO*

Para evaluar si el efecto sobre la viabilidad celular inducido por IGF-I, y en combinación con apoE, está mediado mayoritariamente por alguna de las rutas de señalización canónicas, analizamos la activación de dos de las proteínas quinasas implicadas en cada una de ellas: ERK1/2 y AKT. Tras la estimulación con IGF-I solo y en combinación con las isoformas de apoE, se ha analizado por Western blot la fosforilación en la Thr202 y Tyr204 de ERK1/2 (Fig. 22) y la fosforilación en la Ser473 de AKT (Fig. 23), ya que son residuos cuya fosforilación implica la activación de estas proteínas. En este caso, se han empleado tanto células de endotelio y plexo coroideo, como astrocitos y neuronas, aunque por problemas metodológicos no se ha obtenido señal de inmunodetección aceptable para ser cuantificada en las células de endotelio. Además, tras la estimulación con IGF-I solo se ha conseguido la activación de ERK1/2 en los astrocitos, a diferencia del plexo coroideo y las neuronas, por lo que solo se muestran los resultados que consideramos válidos a nivel metodológico.

En cuanto a la activación de ERK1/2, en la figura 22 se observa que cuando está presente la isoforma apoE4 desciende la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-I, que no ocurre en presencia de apoE2 donde la fosforilación se mantiene significativamente por encima de los niveles basales (** $p < 0,01$). Este mismo efecto de apoE4 se observa en la figura 23, en el caso de la fosforilación de AKT, observándose un descenso en su fosforilación en astrocitos (Fig. 23A) aunque esta disminución no es estadísticamente significativa respecto a la fosforilación que induce el IGF-I, que sí ocurre en el caso de las neuronas ($^{\#}p = 0,029$) (Fig. 23C).

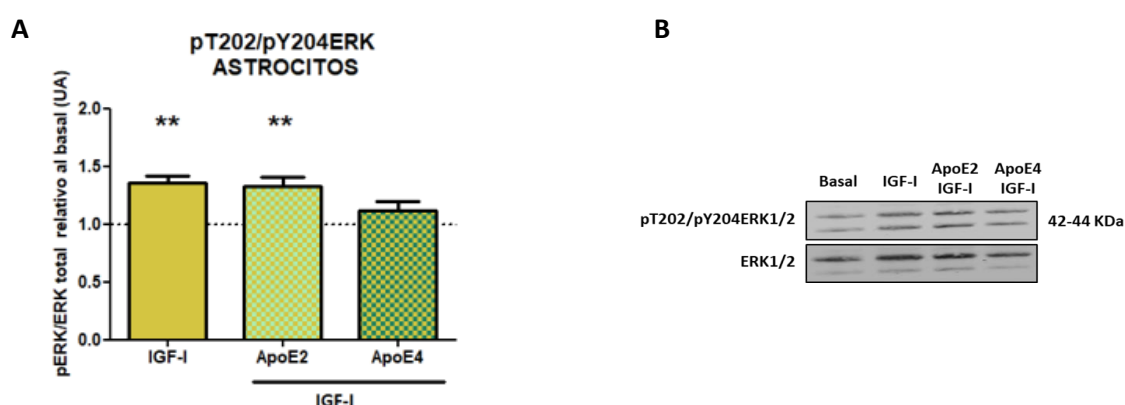


Figura 22. Efecto de apoE2 y apoE4 sobre la fosforilación de ERK1/2 inducida por IGF-I.

Cuantificación de la fosforilación en treonina 202 y tirosina 204 de ERK1/2 respecto a ERK1/2 total en astrocitos tras la estimulación con hIGF-I, en presencia o ausencia de apoE2 o apoE4 y relativizado respecto a la condición basal sin tratamiento (línea discontinua) (A). Imagen representativa de Western blot (B). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, $n=6$, por duplicado. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs basal; $^{\#}\#p < 0,01$ vs IGF-I.

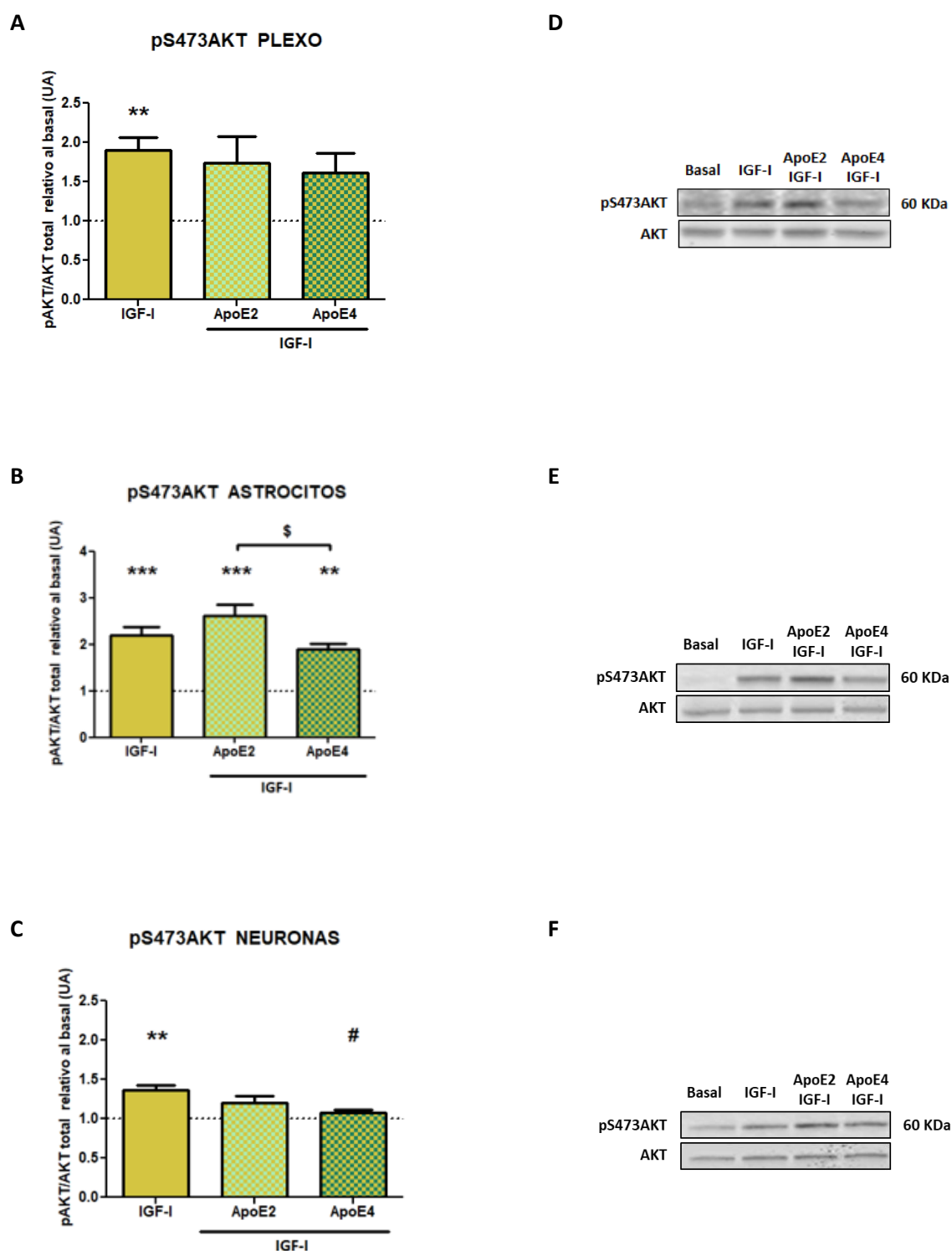


Figura 23. Efecto de apoE2 y apoE4 sobre la fosforilación de AKT inducida por IGF-I.

Cuantificación de la fosforilación en la serina 473 de AKT respecto a AKT total en células del plexo coroideo (A), astrocitos (B) y neuronas (C) tras la estimulación con hIGF-I, en presencia o ausencia de apoE2 o apoE4 y relativizado respecto a la condición basal sin tratamiento (línea discontinua). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=6, por duplicado. ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni: **p<0,01, ***p<0,001, vs basal; #p<0,05 vs IGF-I; \$p<0,05 apoE2+IGF-I vs apoE4+ IGF-I.

Se muestran los Western blots representativos de plexo coroideo (D), astrocitos (E) y neuronas (F).

En definitiva, apoE4 interfiere con la señalización intracelular de IGF-I a través de sus dos rutas canónicas, siendo los astrocitos y las neuronas más susceptibles al efecto de apoE frente al plexo coroideo. ApoE4 disminuye la activación de la ruta PI3K-AKT y MAPK-ERK inducida por IGF-I en astrocitos, pero no inhibe totalmente su efecto, por lo que, a través de estas rutas y en las condiciones experimentales llevadas a cabo aquí, el IGF-I es capaz de producir un efecto parcial cumpliendo con sus funciones celulares, como por ejemplo promoviendo la supervivencia celular evidenciada en el apartado anterior. La ruta AKT podría tener un papel mayoritario sobre esta función concreta, ya que es una ruta clásica de inducción de supervivencia, por inhibición de la apoptosis y en los resultados aquí mostrados, solo en el caso de la fosforilación de AKT se observa un efecto de ligera potenciación sobre la estimulación de IGF-I por parte de apoE2 en astrocitos, correspondiendo con el efecto observado sobre la supervivencia celular.

Hasta el momento, se ha estudiado la implicación que tiene apoE sobre los mecanismos de transporte de IGF-I y sus funciones fisiológicas en el SNC, pero también nos preguntamos si existe una modulación en dirección contraria, donde el IGF-I pueda estar regulando los niveles de apoE producidos localmente en el SNC, que implicaría una regulación cruzada entre ambos sistemas, que pasamos a estudiar en el siguiente apartado.

4.6. EFECTO DE IGF-I SOBRE LA EXPRESIÓN DE APOE POR ASTROCITOS *IN VITRO*

La glía, y concretamente los astrocitos, son las principales células productoras de apoE en el cerebro en condiciones fisiológicas. Para averiguar si los niveles de apoE se encuentran regulados por IGF-I, se trataron cultivos de astrocitos primarios de rata con dosis fisiológicas de hIGF-I durante 24 horas. Mediante Western blot, se han cuantificado los niveles de apoE intracelulares y liberados al medio, considerando tanto la señal de inmunodetección de la forma sializada de apoE (36 KDa) como no sializada (34 KDa), y se observa que la estimulación con IGF-I hace que aumente la liberación de apoE (* $p=0,0118$) mientras que no se ven modificados significativamente los niveles intracelulares (Fig. 24A). Según esto, IGF-I induce la liberación de apoE por astrocitos.

Continuando con el estudio, se pretendió evaluar si este efecto de IGF-I sobre apoE implica también la regulación de la expresión génica. Para ello se trataron los astrocitos con IGF-I a diferentes tiempos y se analizó la expresión de apoE mediante PCR cuantitativa. Los resultados muestran que hay una leve tendencia al incremento de la expresión de apoE progresivo a lo largo del tiempo inducido por IGF-I, pero en ningún caso es estadísticamente significativo (Fig. 24D).

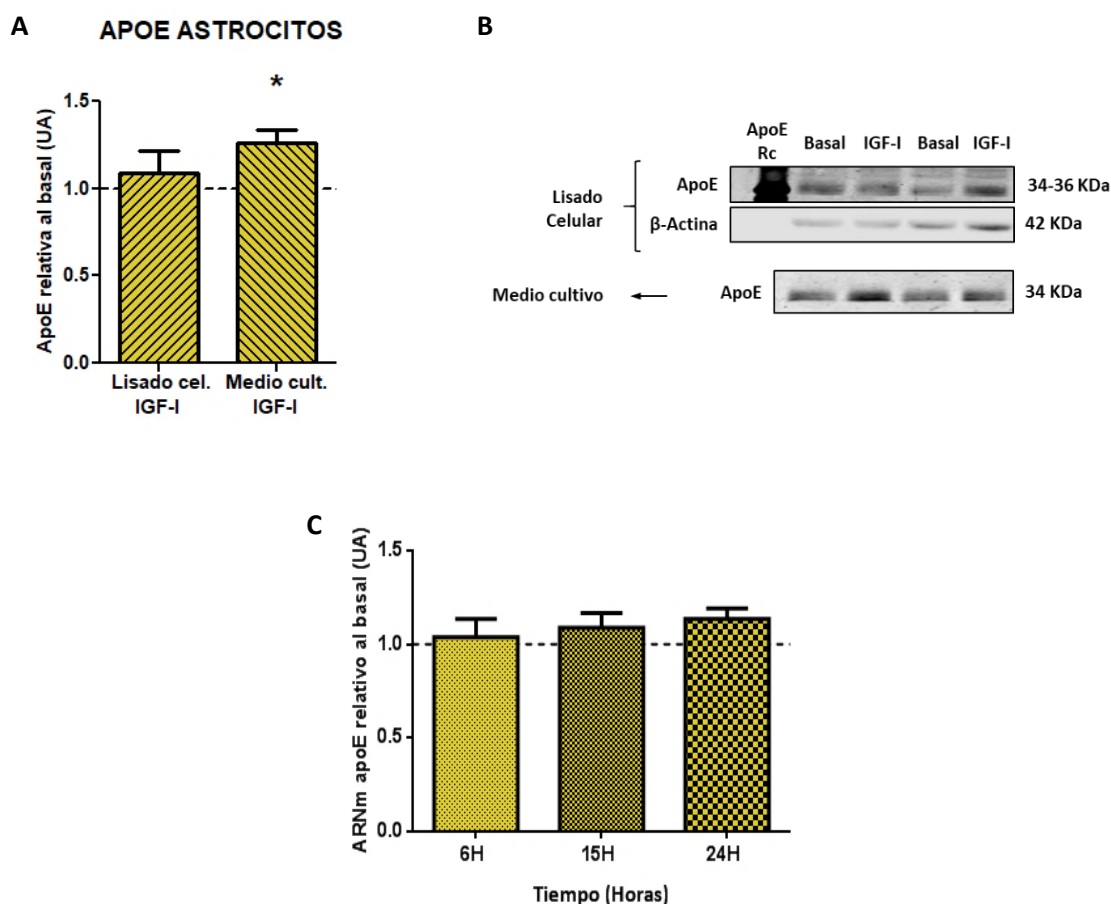


Figura 24. IGF-I induce la liberación de apoE por astrocitos.

Cuantificación de apoE intracelular y liberado por astrocitos en cultivo tras el tratamiento durante 24 horas con hIGF-I y relativizados a sus respectivos niveles basales (línea discontinua) (A). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico. N=3, por triplicado. Prueba t-Student: *p-valor<0,05. Se muestra la imagen representativa de Western blot cuyo primer carril corresponde con la señal de apoE recombinante (ApoE Rc) como control de la banda específica de apoE (B). Cuantificación de ARNm de apoE en astrocitos tratados durante 6, 15 y 24 horas con hIGF-I y relativizados a sus respectivos niveles basales (C). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico n=5. ANOVA de una vía.

Una vez revelado que existe una regulación cruzada entre apoE e IGF-I, y puesto que existen en la literatura numerosas evidencias de la implicación de ambos en la fisiopatología de la EA, en el siguiente capítulo pasamos a estudiar el alcance que tiene la participación conjunta de estas dos proteínas en el contexto de la EA, concretamente estudiando los efectos de IGF-I sobre lo referente a los mecanismos relacionados con la producción y eliminación del péptido A β , y su modulación por apoE.

4.7. EFECTO DE IGF-I y APOE SOBRE EL METABOLISMO DE A β

Una de las características de la EA es la acumulación extracelular del péptido A β , que es tóxico para las células del entorno, conduciendo a su degeneración. A pesar de los numerosos estudios que se pueden encontrar en la literatura, que se esfuerzan en esclarecer la fisiopatología de esta enfermedad tan compleja, no se ha llegado a establecer si la acumulación de A β es una causa para el desarrollo de la patología, o una consecuencia de las alteraciones producidas por otros eventos celulares iniciales. No obstante, se han aportado numerosos datos que coinciden en que, sea o no la causa, la acumulación de A β empeora el curso de la enfermedad. Por lo que evitando esta acumulación, se podría al menos ralentizar el avance de la EA, lo que hace interesante seguir investigando acerca de los mecanismos relacionados con este proceso.

En la literatura ya existen datos sobre la implicación tanto de IGF-I como de apoE en lo referente a la producción y/o acumulación de A β , con diferentes enfoques, incluso opuestos, dependiendo de la aproximación experimental abordada y el mecanismo estudiado. Por lo que pretendemos aportar datos nuevos, que permitan mostrar la participación de IGF-I y apoE en lo referente a la generación del péptido A β , estudiando tanto la expresión de la proteína APP de la que proviene, como su procesamiento, así como en los mecanismos de eliminación del péptido.

4.7.1. Interacción entre IGF-IR y APP

El IGF-IR y la APP son proteínas que se localizan ancladas a la membrana plasmática y ambas tienen dominios de interacción con otras proteínas de membrana, como el LRP1. Por tanto, cabe pensar que ambas proteínas pudieran estar interaccionando entre sí, y hemos comenzado analizando si existe una asociación entre IGF-IR y APP. Mediante la técnica de PLA, que permite la visualización de dos proteínas inmunomarcadas sólo cuando se encuentran muy próximas entre sí, se ha podido demostrar cualitativamente que existe interacción entre ambas proteínas. La señal de PLA (puntos rojos) se visualiza cuando se emplean anticuerpos específicos para marcar ambas proteínas, en cultivos de astrocitos (Fig. 25B) y neuronas (Fig. 25D), frente a la prácticamente ausencia de señal inespecífica aportada por las sondas en ausencia de anticuerpo primario (Fig. 25A y C para astrocitos y neuronas, respectivamente).

También se demuestra la interacción, mediante la inmunodetección del IGF-IR asociado al APP inmunoprecipitado en cultivo de astrocitos y en tejido de corteza cerebral de ratón (Fig. 25E). Sin embargo, debido a la sensibilidad de la técnica, no ha sido posible detectarlo en

neuronas, donde por la señal de PLA se evidencia que en este tipo celular ambas proteínas se encuentran interaccionando en menor proporción, que en astrocitos.

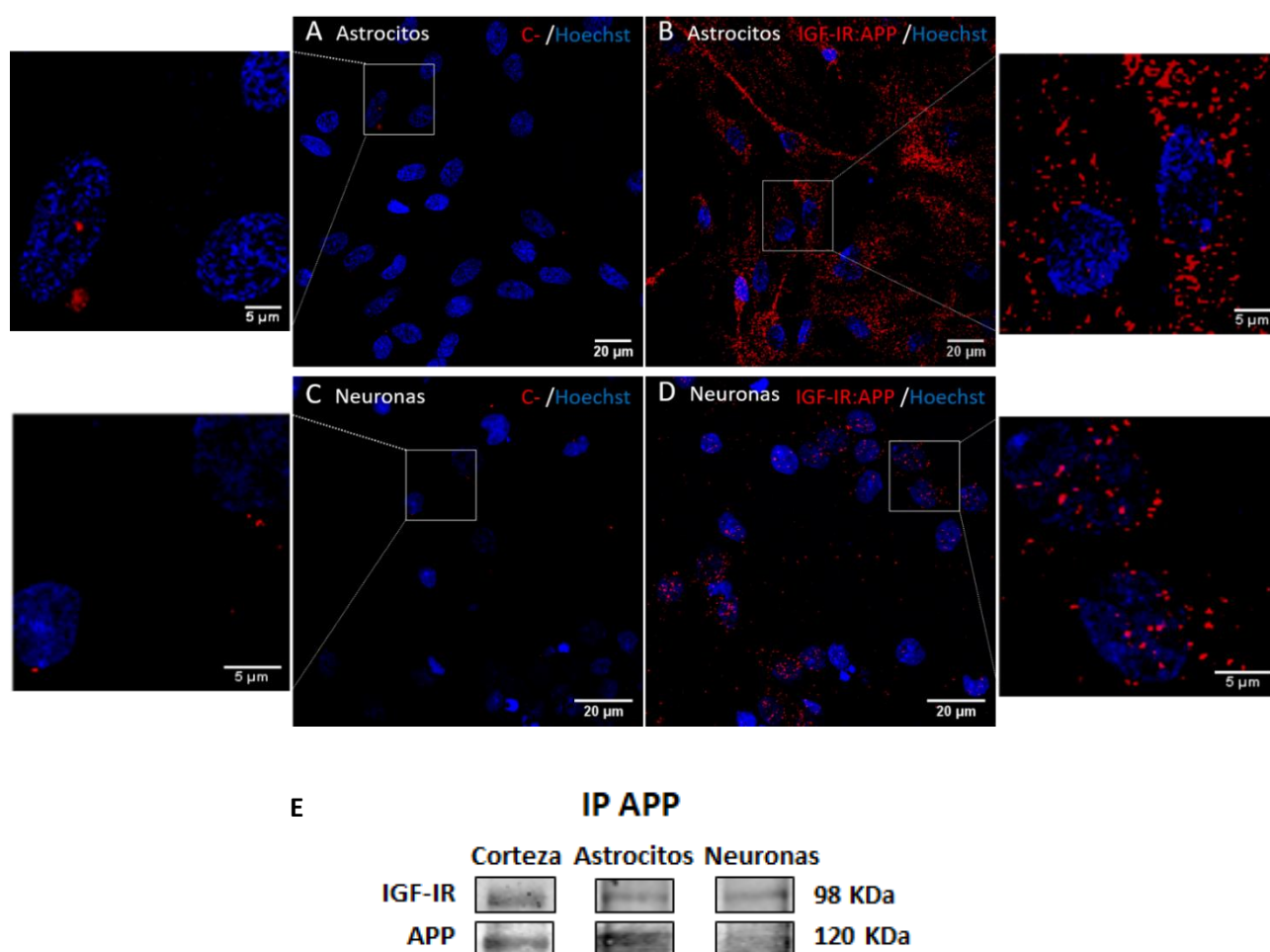


Figura 25. Interacción entre el IGF-IR y APP.

Microfotografías de astrocitos (A y B) y neuronas (C y D) marcando mediante PLA la interacción entre el IGF-IR y APP (puntos rojos). Se muestra la señal inespecífica de las sondas (A y C) así como la señal específica por el inmunomarcaje con cada uno de los anticuerpos (B y D). La barra de escala corresponde a 20 μ m y en las ampliaciones a 5 μ m. N=3. También se muestran las imágenes representativas de Western blot (E) correspondientes a la inmunoprecipitación de APP y la inmunodetección del propio APP precipitado y el IGF-IR asociado, en tejido de corteza cerebral de ratón y cultivos primarios de astrocitos y de neuronas de rata.

4.7.2. Efecto de IGF-I y apoE en el procesamiento de APP *in vitro*

Según el procesamiento que sufra el APP por diferentes tipos de secretasas se produce la generación de A β en la vía amiloidogénica o, en contraposición, se puede evitar su producción si ocurre un procesamiento por la vía no amiloidogénica. Parece que la intervención de un tipo u otro de estas enzimas depende de la localización celular en la que se encuentre el APP que, a

su vez, puede verse modulada por la asociación entre APP a otras proteínas de membrana. Dado que hemos demostrado que APP interacciona físicamente con el IGF-IR, que a su vez interacciona con el LRP1, y que en la literatura existen evidencias de la interacción también entre APP y LRP1 (Ulery et al., 2000), mediante la intervención de los ligandos de los respectivos receptores, se puede alterar la localización de las proteínas implicadas y/o el complejo de proteínas y por tanto, en último término, modificar el procesamiento que sufra APP. Por todo ello, proponemos que IGF-I y apoE podrían intervenir en este proceso. Para averiguarlo, se ha estudiado mediante Western blot uno de los productos generados tras su procesamiento, como es la fracción soluble del APP liberado al medio, tras el tratamiento durante 24 horas con IGF-I y apoE de cultivos de astrocitos y neuronas.

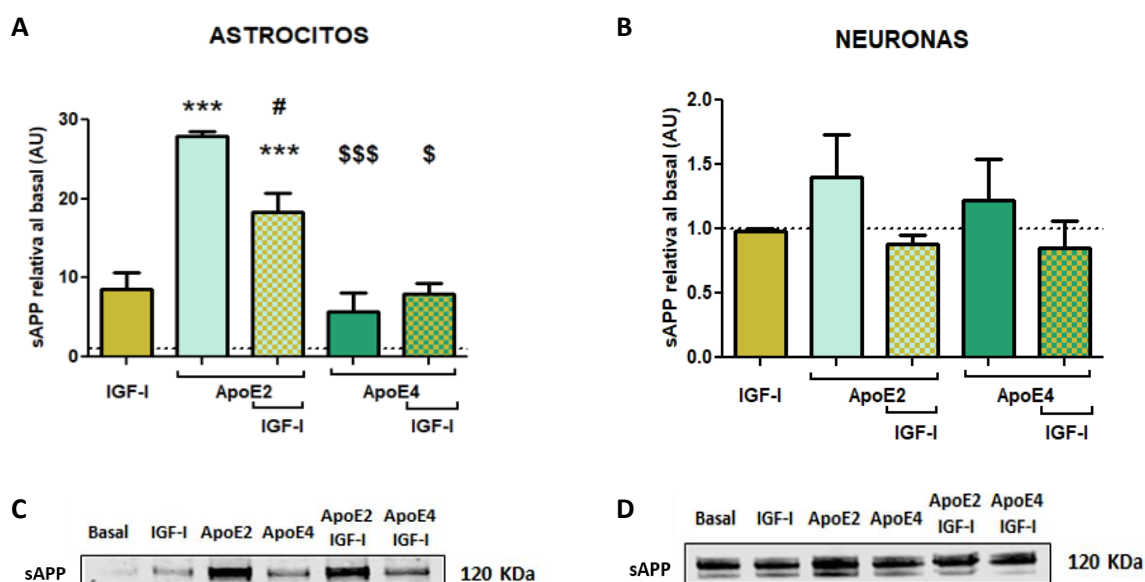


Figura 26. ApoE estimula de manera isoforma-dependiente la producción de sAPP en astrocitos, cuyo efecto es modulado por IGF-I.

Cuantificación del sAPP liberado al medio en astrocitos (A) y neuronas (B) tratados durante 24 horas con hIGF-I en presencia o ausencia de apoE2 o apoE4, normalizadas por volumen (1 ml/carril) y relativizado a sus respectivos niveles basales (línea discontinua). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, $n=4$, ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni: *** $p<0,001$ vs basal, # $p<0,05$ vs IGF-I, \$ $p<0,05$ vs apoE2+IGF-I, \$\$\$ $p<0,001$ vs apoE2. Se muestran los Western blots representativos de astrocitos (C) y neuronas (D).

Los resultados muestran que IGF-I y apoE modulan el procesamiento de APP tan solo en astrocitos (Fig. 26A), coincidiendo con que en estas células hemos observado mayor interacción IGF-IR/APP. El IGF-I favorece la producción de sAPP, aunque no forma significativa e Interestingly, cambia su efecto dependiendo de la isoforma de apoE presente

($^{\$}p=0,014$). IGF-I en combinación con apoE2 promueve aún más la formación sAPP ($^{\#}p=0,022$), mientras que esto no ocurre con apoE4. Esto puede deberse al propio efecto que ejercen las isoformas de apoE de forma individual, ya que apoE2 estimula más la producción de sAPP que apoE4 ($^{\$ \$ \$}p<0,001$). Aunque tanto IGF-I como apoE2 favorecen la producción de sAPP, la combinación de ambos no produce un efecto sumatorio respecto a su acción por separado.

Por su parte, en las neuronas no se producen cambios estadísticamente significativos (Fig. 26B), con la tendencia de que ambas isoformas de apoE también estimularían la producción del sAPP, revertido por IGF-I.

4.7.3. Efecto de IGF-I y apoE en la expresión de APP *in vitro*

Para conocer si se modifica la cantidad de sustrato sobre el que actúen las secretasas, hemos estudiado si IGF-I y apoE regulan la expresión del APP. Tras tratar cultivos de astrocitos y neuronas durante 24 horas con IGF-I en presencia y ausencia de apoE2 y apoE4 previamente lipidadas con DMPC, se ha determinado mediante PCR cuantitativa la expresión génica de APP, y no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos tipos celulares (Fig. 27).

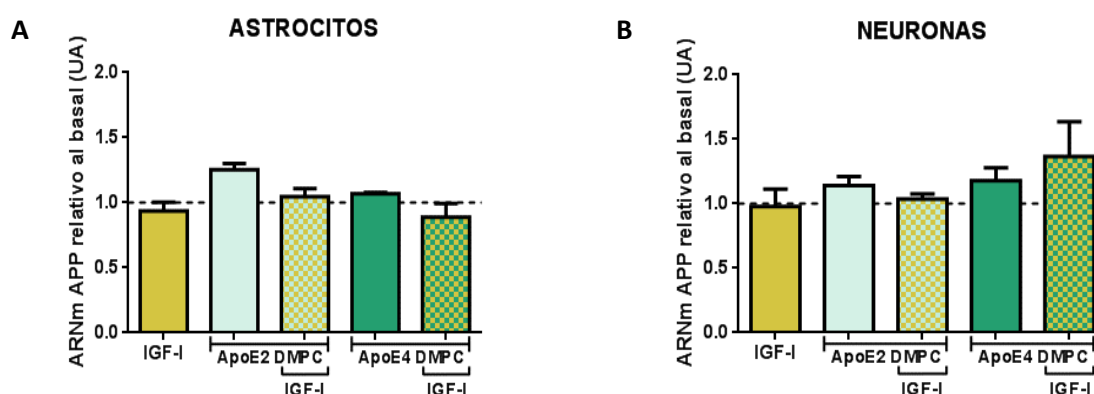


Figura 27. IGF-I y apoE no modifican la expresión génica de APP en neuronas y astrocitos en cultivo. Niveles de ARNm de APP en astrocitos (A) y neuronas (B) tratados durante 24 horas con hIGF-I en presencia o ausencia de apoE2 y apoE4 lipidadas con DMPC, y relativizado a sus respectivos niveles basales (línea discontinua). Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, $n=5$, ANOVA de una vía.

A nivel de expresión génica, ni apoE ni IGF-I modifican significativamente los niveles de APP, viéndose modulado solo su procesamiento. Esto último, podría estar influido por las interacciones proteicas con el IGF-IR y/o LRP1. Para profundizar en la implicación que tiene el IGF-IR y apoE sobre los niveles de APP, se ha estudiado en un modelo *in vivo* de lesión por

isquemia en ratones que expresan en astrocitos un IGF-IR truncado que no transmite la señal del IGF-I.

4.7.4. Implicación del IGF-IR en la expresión de APP y apoE en un modelo de isquemia hemorrágica

Durante los mecanismos de reparación tras un daño cerebral, se incrementa la expresión de IGF-I, APP y apoE. Por ello, se ha elegido un modelo de isquemia cerebral como herramienta experimental para inducir el aumento de expresión de estas proteínas en ratones FIRKO-T, que expresan el IGF-IR truncado específicamente en astrocitos, bajo regulación por tamoxifeno. Este modelo animal permite estudiar el impacto del IGF-IR sobre la expresión de APP y también de apoE. Tras realizar una isquemia cerebral unilateral de tipo hemorrágico en el animal FIRKO-T, y sus respectivos controles, administrados con vehículo, se ha analizado mediante inmunohistoquímica la expresión de APP (Fig. 28) y apoE (Fig. 29) por astrocitos (GFAP+) y neuronas (NeuN+) en la corteza peri-lesión del hemisferio ipsilateral y la región equivalente del hemisferio contralateral. Todo el estudio se ha realizado transcurridos 7 días desde la cirugía, una vez superada la ventana temporal de formación de edema vascular. En el anexo II se muestra la región de la corteza cerebral que se ve afectada por la lesión, visualizada mediante la tinción histológica por TTC del tejido sano.

Los resultados se muestran en las figuras 28 y 29, donde se observa que en los animales FIRKO-T administrados con tamoxifeno, es decir con el IGF-IR inactivo, se incrementa la expresión de APP en neuronas (colocaliza con el marcaje neuronal de NeuN Fig. 28, flechas). Tal aumento en la señal de APP es visible ya en el hemisferio contralateral, y se hace más evidente, en el hemisferio ipsilateral. Por lo que la expresión del IGF-IR truncado en astrocitos hace que se produzca un incremento de APP, pero no en este tipo celular, sino en las neuronas. De manera similar ocurre con apoE, donde en el lado contralateral de la lesión se observa marcaje de apoE que colocaliza con astrocitos GFAP+ (Fig.29, puntas de flecha) y también sorprendentemente, con neuronas NeuN+ (Fig. 29, flechas), que aumenta en los animales administrados con tamoxifeno. En el lado lesionado, se observa un aumento del marcaje de apoE sobre todo por astrocitos GFAP+, que igualmente es más notable en los animales inyectados con tamoxifeno.

En resumen, tras lesión cerebral, se ve inducida la expresión de APP y apoE y cuando el IGF-IR deja de ser funcional en los astrocitos, se incrementa la cantidad de APP y también de apoE, por lo que el IGF-IR, presumiblemente por la interacción con APP y LRP1 está modificando los niveles de APP y apoE.

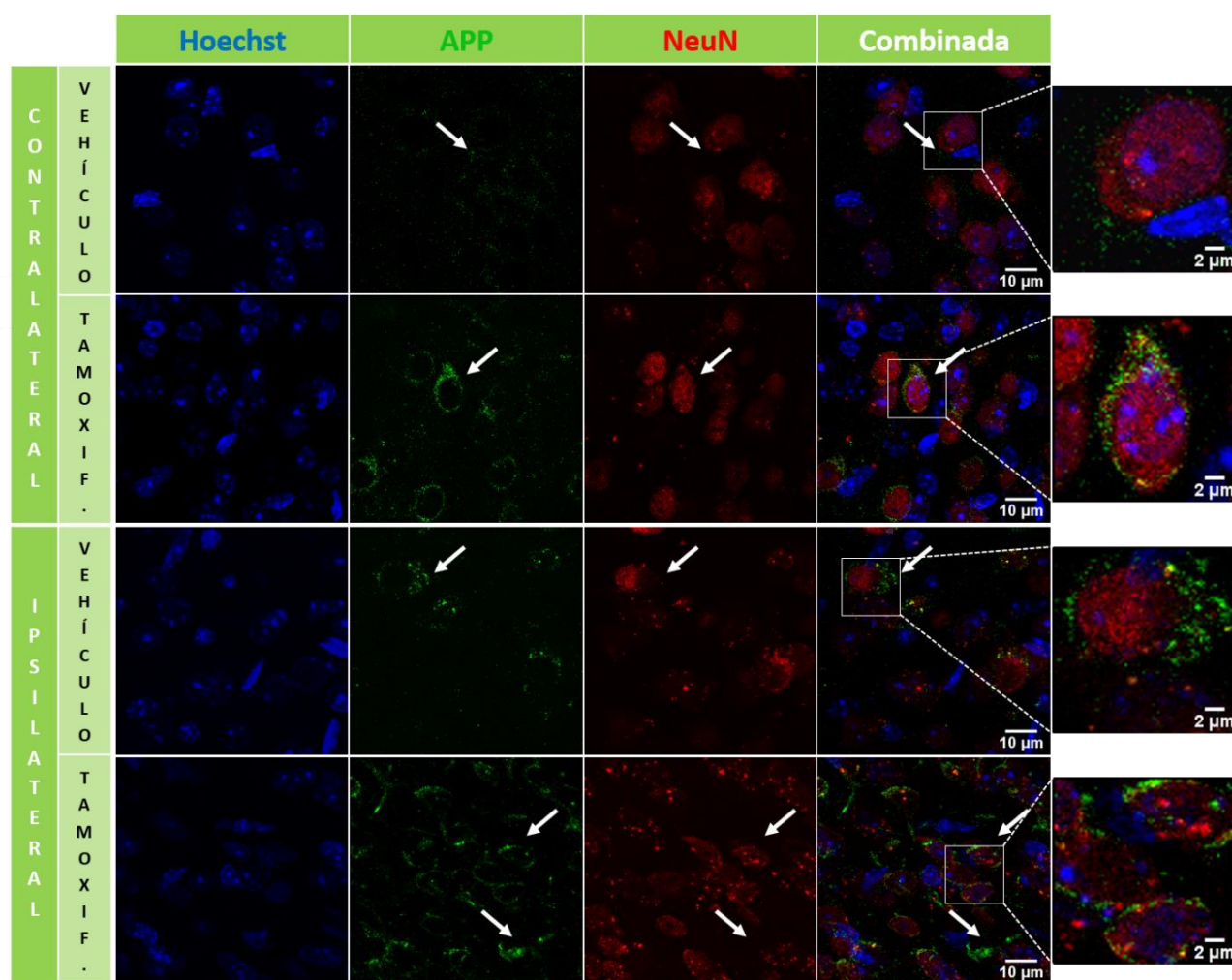


Figura 28. Microfotografías de inmunohistoquímica de APP y NeuN en tejido isquémico de ratones FIRKO-T.

Se muestra el inmunomarcaje de APP (verde), NeuN (rojo) y los núcleos celulares (azul) en la corteza contralateral e ipsilateral del hemisferio lesionado, en animales inyectados con vehículo o tamoxifeno (n=3). Las flechas indican la colocalización APP+/NeuN+. Barra de escala correspondiente a 10 µm y en las ampliaciones a 2 µm. N=3 por duplicado.

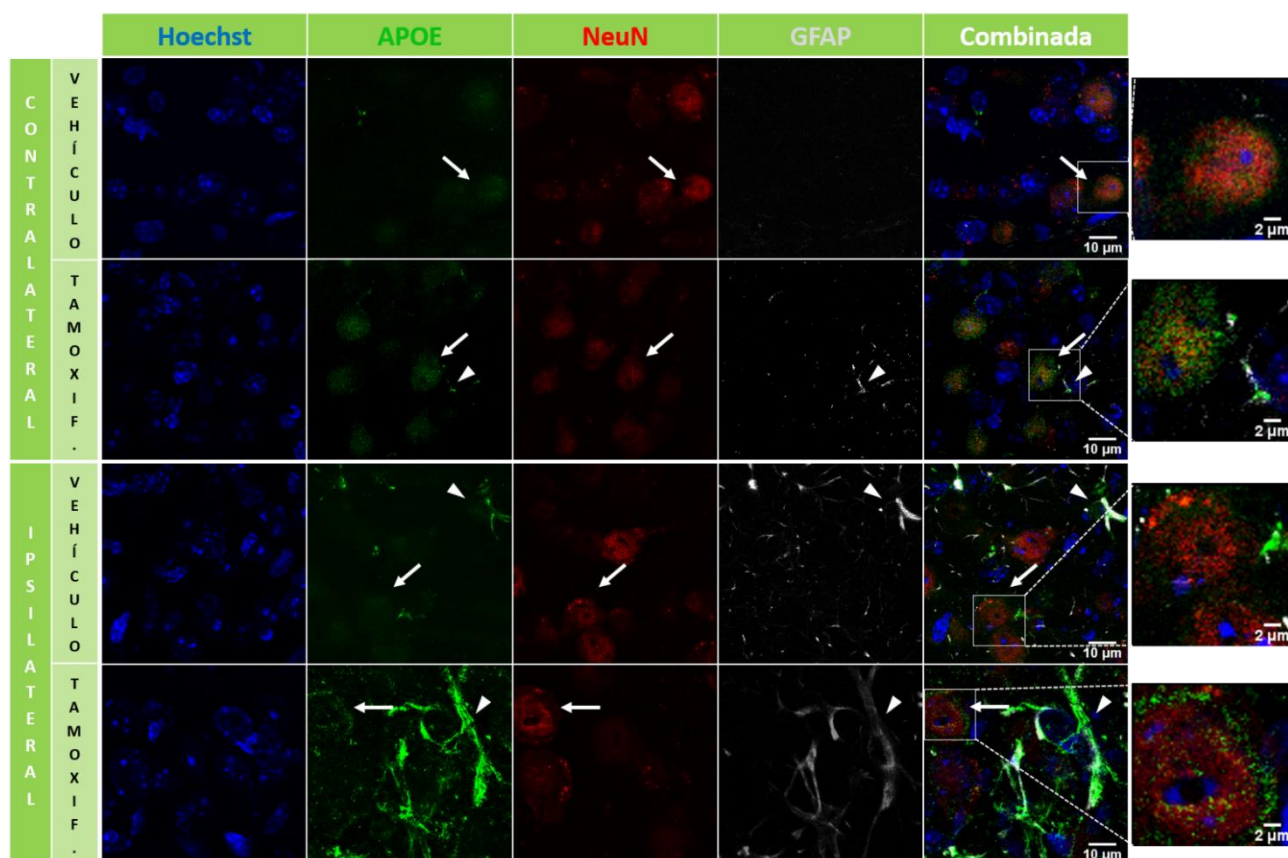


Figura 29. Microfotografías de inmunohistoquímica de apoE, NeuN y GFAP en tejido isquémico de ratones FIRKO-T. Inmunomarcage de apoE (verde), NeuN (rojo), GFAP (gris) y los núcleos celulares (azul) en la corteza contralateral e ipsilateral del hemisferio lesionado, en animales inyectados con vehículo o tamoxifeno (n=3). Las flechas indican la colocalización apoE+/NeuN+ y las puntas de flecha la colocalización ApoE+/GFAP+. Barra de escala correspondiente a 10 µm y en las ampliaciones a 2 µm. N=3 por duplicado.

La hipótesis de la cascada amiloide, para explicar la patogenia de la EA, postula que la acumulación aberrante de A β puede deberse tanto a la sobreproducción, como a un defecto en los mecanismos de eliminación, y un desequilibrio entre ambos procesos. Aunque hemos visto que la producción de A β podría encontrarse modificada por IGF-I y apoE durante el procesamiento del APP, también nos ha resultado interesante averiguar si IGF-I y apoE intervienen en los mecanismos de eliminación de A β , cuyos resultados se detallan a continuación.

4.7.5. Efecto de IGF-I y apoE en la internalización de A β 40 *in vitro*

Los astrocitos y la microglía son las principales células aclaradoras del A β en el SNC, y esta función es asumida por los hepatocitos a nivel sistémico. Por este motivo, se ha evaluado, la internalización de A β 40 soluble en cultivos primarios de estos tres tipos celulares, bajo la estimulación de hIGF-I en combinación con dos de las isoformas humanas de apoE. Tras permitir a las células la internalización de A β 40 fluorescente en cada una de las condiciones experimentales, se ha cuantificado la fluorescencia presente en el interior celular mediante fluorimetría. Los resultados indican que el IGF-I estimula la internalización de A β 40, tanto en astrocitos (*p=0,023) (Fig. 30A, y 31) como en hepatocitos (*p=0,012) (Fig. 30C y 33). En el caso de los hepatocitos, la dosis de IGF-I se ha incrementado a 10nM respecto a la dosis en astrocitos (1nM), ya que los niveles de IGF-I producidos por los hepatocitos en condiciones fisiológicas son mucho mayores que los producidos por los astrocitos. Por el contrario, en células de microglía (Fig. 30B y 32), el IGF-I inhibe la internalización de A β 40 (*p=0,011). En cuanto a la acción de las isoformas apoE2 y apoE4, ambas se encuentran inhibiendo el efecto de IGF-I, pero de manera dependiente de isoforma, siendo significativamente mayor la inhibición producida por apoE4 frente a apoE2 en astrocitos (^{\$}p=0,013) (Fig. 30A) y hepatocitos (^{\$}p=0,012) (Fig. 30C). Así, apoE4 ejerce una fuerte inhibición del efecto de IGF-I en los dos tipos celulares (####p<0,0001) y en astrocitos promueve, incluso bajo la estimulación de IGF-I, una reducción de la internalización de A β 40 respecto a la internalización basal (**p=0,0067).

Por su parte, en microglía las isoformas de apoE parecen comportarse de manera similar, y no modifican significativamente la inhibición ya observada por IGF-I, aunque sí parece que haya una tendencia a que, en presencia de ambas isoformas, se inhibe aún más la internalización de A β 40 producida por IGF-I. En las figuras 31, 32 y 33 se muestran imágenes representativas de células de astrocitos, microglía y hepatocitos, respectivamente, tras la internalización de A β 40 fluorescente (verde) bajo cada una de las condiciones experimentales.

Otro de los mecanismos por los que el A β puede ser aclarado del cerebro es mediante su transporte hacia la sangre por las células endoteliales de los vasos sanguíneos, por lo que contando con el sistema *in vitro* de doble cámara, se ha evaluado el transporte de A β 40 fluorescente soluble, por transcitosis desde el lado abluminal al lado luminal (Fig. 7) en células endoteliales, en presencia o no de IGF-I y de las isoformas de apoE. Los resultados (Fig. 30D) muestran que el IGF-I tiende a disminuir el transporte de A β 40 soluble, sin adquirir significancia estadística, y apoE2 anula el efecto de IGF-I ([#]p=0,022) restaurando su transporte hasta niveles similares a los basales.

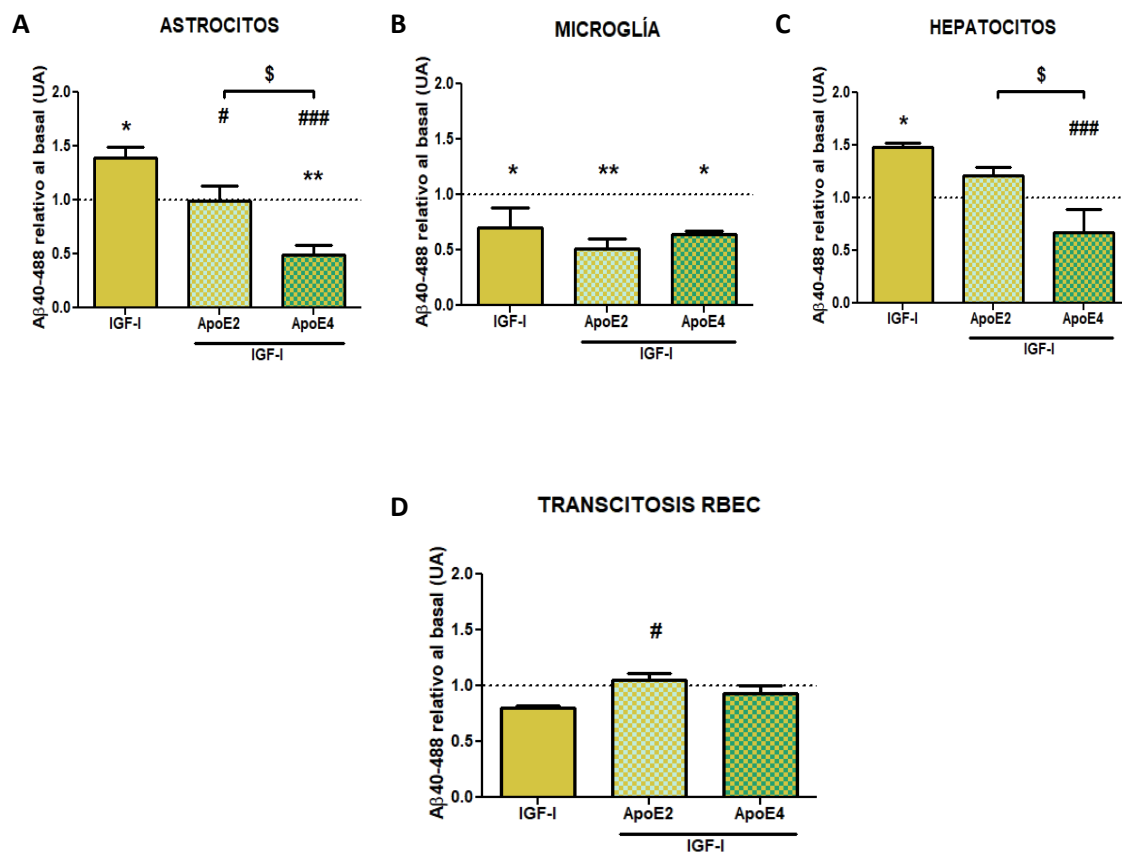


Figura 30. El IGF-I favorece la Internalización de Aβ40 soluble por astrocitos y hepatocitos y apoE modula su efecto dependiente de isoforma, mientras que se inhibe en microglía.

Cuantificación de la fluorescencia emitida por Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 soluble internalizado por astrocitos (A), microglía (B) y hepatocitos (C), así como su transporte por transcitosis en células de endotelio (D), durante 15 horas, inducido por hIGF-I en presencia o ausencia de apoE2 o apoE4. Resultados expresados como media ± error típico en unidades arbitrarias (UA) relativizados a sus respectivos niveles basales (línea discontinua). A, B y C: n=4, ANOVA de una vía, post-hoc Bonferroni: *p<0,05 y **p<0,01 vs basal; #p<0,05 y ###p<0,001 vs IGF-I; \$p<0,005 apoE2 vs apoE4. D: n=3, ANOVA de dos vías, post-hoc Bonferroni: #p<0,05 vs IGF-I.

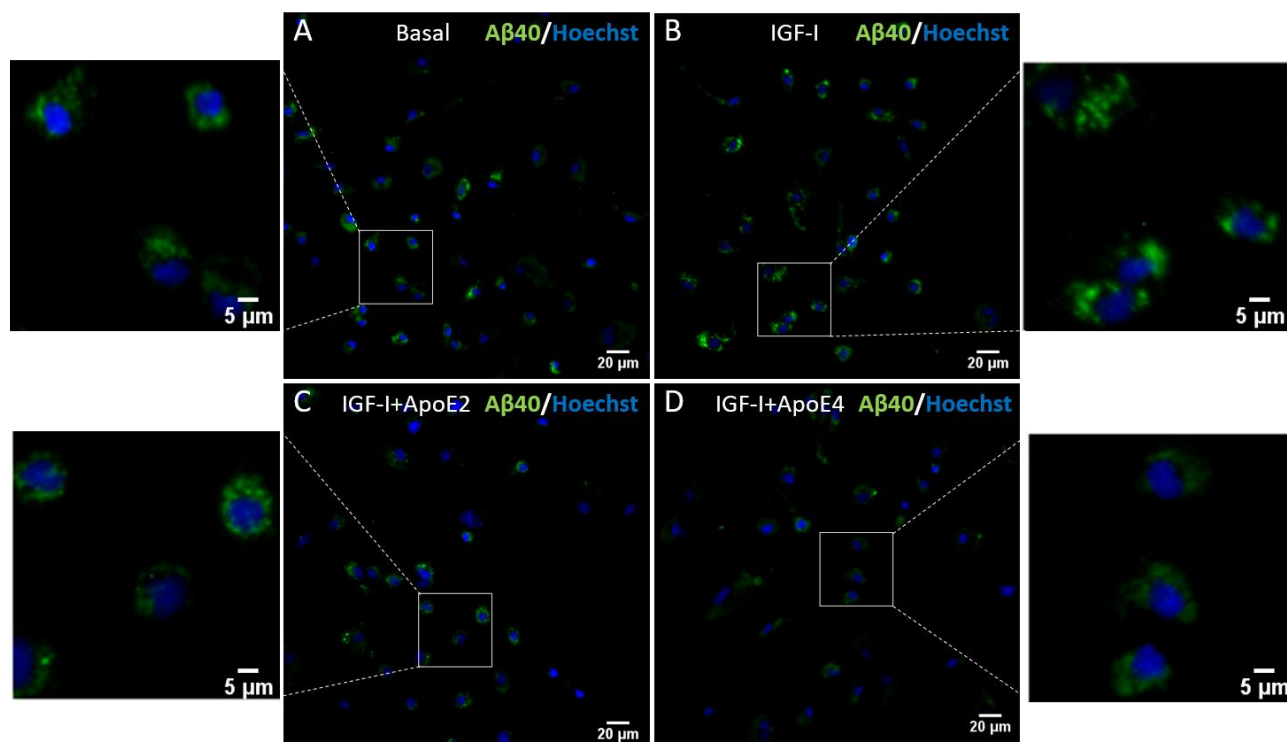


Figura 31. Microfotografías de astrocitos con Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 soluble internalizado.

Se muestra la señal procedente del Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 (verde) y los núcleos celulares (azul) tras su internalización durante 15 horas en condiciones basales (A), estimulados con IGF-I (B), IGF-I junto a apoE2 (C) e IGF-I junto a apoE4 (D). Barra de escala correspondiente a 20 μm.

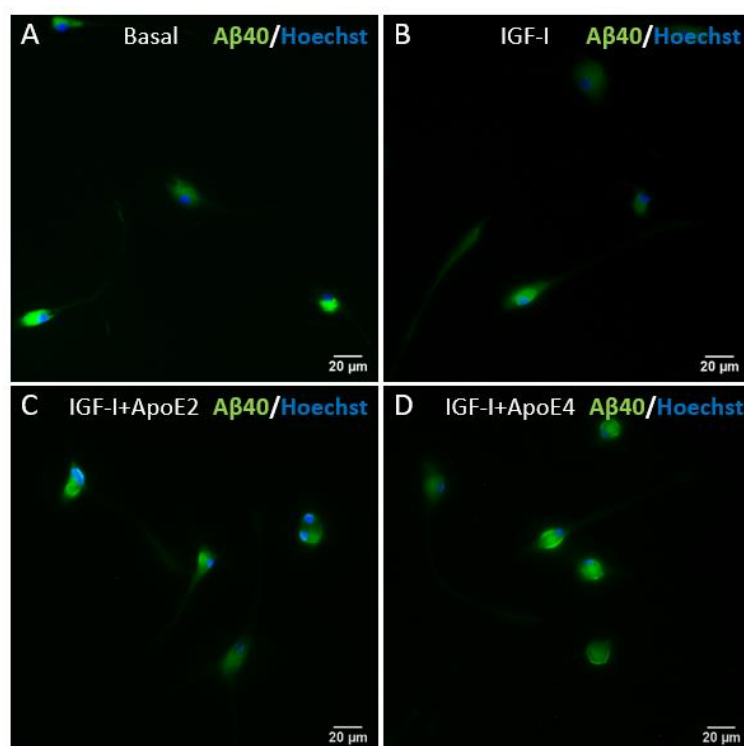


Figura 32. Microfotografías de microglía con Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 internalizado.

Se muestra la señal procedente del Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 (verde) y los núcleos celulares (azul) tras su internalización durante 15 horas en condiciones basales (A), estimulados con IGF-I (B), IGF-I junto a apoE2 (C), e IGF-I junto a apoE4 (D). Barra de escala correspondiente a 20 μm.

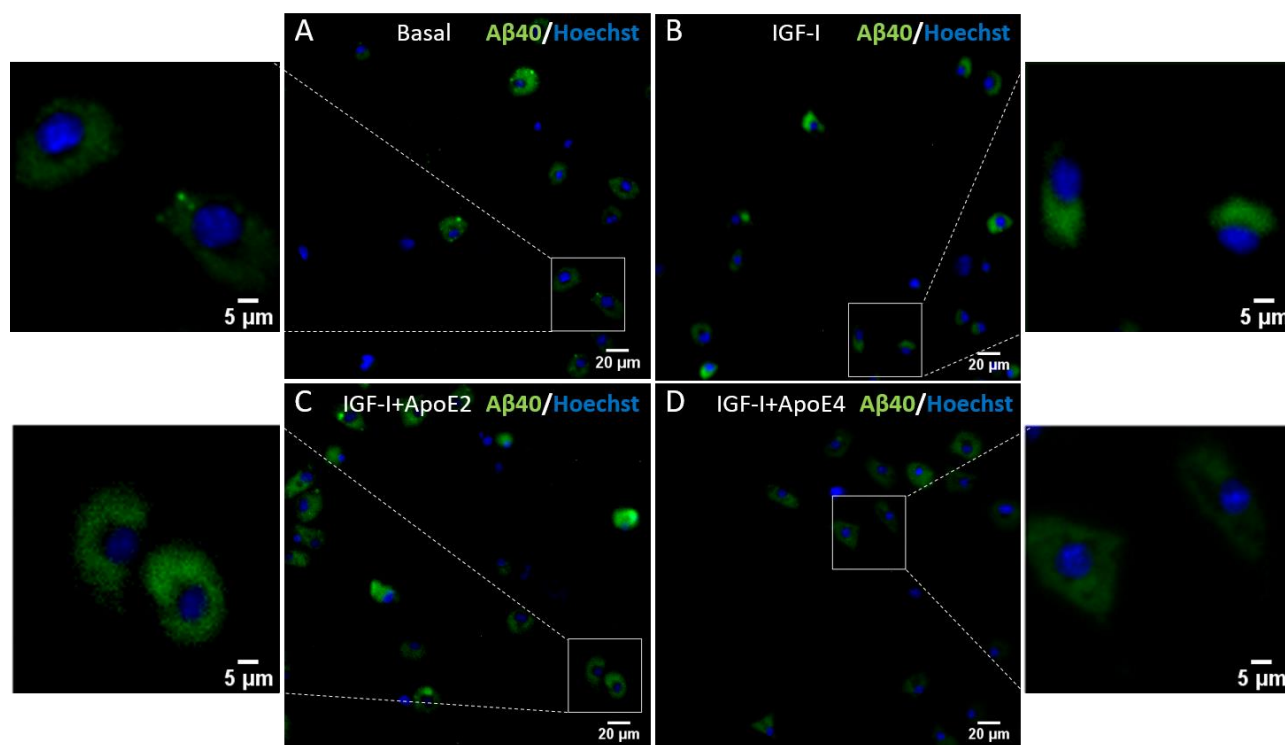


Figura 33. Microfotografías de hepatocitos con Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 internalizado.

Se muestra la señal procedente del Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 (verde) y los núcleos celulares (azul) tras su internalización durante 15 horas en condiciones basales (A), estimulados con IGF-I (B), IGF-I junto a apoE2 (C), e IGF-I junto a apoE4 (D). Barra de escala correspondiente a 20 μm.

Dado que en los hepatocitos en cultivo el IGF-I promueve la internalización de IGF-I, y este efecto se ve inhibido por apoE4, se ha comprobado el efecto de IGF-I y apoE sobre el aclaramiento de Aβ40 por el hígado *in vivo*. En ratones con sobrepeso que, como se ha mostrado en la figura 18 presentan elevados niveles plasmáticos de IGF-I y apoE, se ha inyectado Aβ40 fluorescente soluble por vía periférica a través de la vena lateral de la cola, y se ha medido su aclaramiento a través del hígado.

4.7.6. Efecto de IGF-I y apoE en el aclaramiento periférico de Aβ40

Transcurridos 90 minutos desde la inyección periférica de Aβ40-HiLyte Fluor™ 488 soluble, se ha cuantificado la fluorescencia en el suero e hígado de los animales con sobrepeso y sus respectivos controles. Los resultados se muestran en la figura 34, que revelan que se produce una marcada disminución de los niveles de Aβ40 fluorescente en el suero (Fig. 34A) en los animales con sobrepeso, que se corresponde con un aumento de los niveles en hígado (Fig. 34B), por lo que, en los animales con sobrepeso el Aβ es eliminado de la sangre, aclarándose a través del hígado, más rápidamente que en los animales control.

Estos resultados, podrían deberse al efecto que tiene IGF-I promoviendo la internalización de A β 40 por los hepatocitos. Además, a pesar de estar elevada también la concentración en suero de apoE en los animales con sobrepeso, ésta no es capaz de inhibir el efecto de IGF-I, de manera similar a como se ha visto que actúa la isoforma apoE2 en los hepatocitos *in vitro*, aunque en este caso no se está evaluando el efecto de ninguna isoforma humana, puesto que la proteína apoE expresada por estos animales corresponde con la forma endógena de apoE murina.

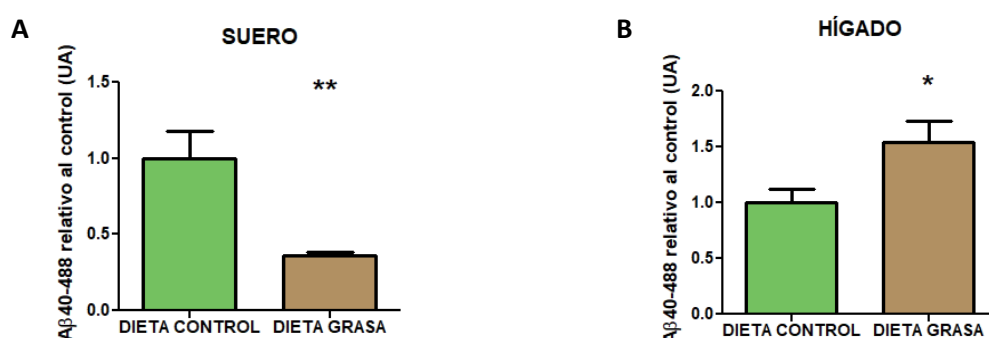


Figura 34. Los animales con sobrepeso presentan mayor aclaramiento de A β 40 por el hígado

Cuantificación de la fluorescencia emitida por A β 40-HiLyte Fluor™ 488 soluble presente en el suero (A) e hígado (B) de animales control y sometidos a dieta con alto contenido en grasa, transcurridos 90 minutos desde la inyección periférica de A β 40-HiLyte Fluor™ 488. Resultados expresados como media \pm error típico en unidades arbitrarias (UA) relativizado a los animales control. n=4, T-test: *p<0,05 y **p<0,01 vs control.

5

Discusión



La EA es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial que afecta a millones de personas en todo el mundo y cuya prevalencia incrementa con el aumento de la esperanza de vida. Esto ha llevado a un creciente interés sobre el estudio de esta enfermedad, lo que ha generado un gran número de trabajos científicos aportando nuevos datos significativos acerca de su fisiopatología. Así, en las últimas décadas ha aumentado el número de estudios en los que se relacionan alteraciones de la homeostasis lipídica con el desarrollo de EA. Se han encontrado desequilibrios en la composición de las lipoproteínas, así como en las enzimas encargadas de la esterificación del colesterol en los pacientes con EA y que afecta a aspectos relacionados con el metabolismo del A β (Laitinen et al., 2006; Puglielli et al., 2003; Refolo et al., 2001; Shobab et al., 2005; Wollmer et al., 2003). Por su parte, con la dislipidemia producida por la obesidad, se genera un síndrome metabólico periférico con una marcada resistencia a insulina e IGF-I, que repercute en el SNC, manifestado en problemas cognitivos (Eskelinen et al., 2008; Farr et al., 2008; Kothari et al., 2017; Suzuki et al., 2010) que son trastornos característicos de la DMII (McNay et al., 2010; Ryan et al., 2006; Vanhanen et al., 1998) y propios de la EA (Arnold et al., 2018; Moloney et al., 2010; Petrov et al., 2015; Salameh et al., 2016; Talbot et al., 2012), por lo que la EA y la DMII presentan características comunes, y hasta se ha llegado a proponer que la EA podría ser considerada como una enfermedad metabólica similar a la diabetes (Steen et al., 2005).

Esto hace pensar que existe una relación entre la deficiencia en la señalización por insulina/IGF-I y la pérdida de homeostasis del metabolismo lipídico con consecuencias patológicas e implicadas en la EA. Pero dada la controvertida implicación del IGF-I y su receptor en la EA (Gontier et al., 2015; Logan et al., 2018), es necesario seguir investigando el papel que podría jugar este factor trófico en esta patología, especialmente en lo relacionado con el sistema lipídico, donde la apoE juega un papel fundamental y cuyo genotipo se ha establecido como el principal factor de riesgo genético para el desarrollo de la EA (Dong et al., 1996; Roses, 1996; Weisgraber and Mahley, 2018). Por todo ello, en este trabajo se ha pretendido contrastar la hipótesis que postula que el IGF-I y la apoE podrían estar desempeñando papeles cruciales en mecanismos comunes y relacionados con la EA. Principalmente se han realizado estudios *in vitro* en los que se ha trabajado con las proteínas recombinantes de las isoformas de apoE humanas, apoE2 y apoE4, que pese a ser las menos frecuentes en la población humana, son las que directamente se han relacionado con la EA (Roses, 1996).

ApoE aporta solubilidad a las partículas lipídicas con las que se asocia, pero la flexibilidad que posea el dominio C-terminal es determinante para el área de superficie hidrofóbica que

interacciona con los lípidos, y por tanto para su solubilización (Innerarity et al., 1986; Saito et al., 2001). Así, el reemplazamiento de residuos de cisteínas por argininas produce un descenso en la hidrofobicidad y estabilidad del complejo de las hélices- α en la estructura de apoE, por lo que apoE4 posee una estructura más globular, con mayores interacciones entre sus dominios N-terminal y C-terminal, lo que confiere compactación y menor estabilidad promovida por la Arg112 (Chen et al., 2011; Hatters et al., 2006; Zaiou et al., 2000). Esto también se ha relacionado con su posible preferencia por las VLDL plasmáticas, frente a la preferencia por las HDL plasmáticas de las otras dos isoformas, lo que hace que se incremente la concentración de colesterol plasmático, tal como se ha observado en individuos portadores de esta isoforma (Jarvik et al., 1995; Notkola et al., 1998). En cambio, en el CSF, los individuos que expresan la isoforma de apoE4, presentan menores concentraciones de colesterol que aquellos con las otras isoformas de apoE, por lo que, a diferencia de lo que ocurre a nivel periférico, las lipoproteínas asociadas a apoE4 en el CSF podrían ser metabolizadas más eficientemente que las lipoproteínas asociadas a apoE2 y apoE3 (Yamauchi et al., 1999). Además, apoE3 promueve la liberación del colesterol producido por los astrocitos en mayor medida que apoE4 (Gong et al., 2002; Michikawa et al., 2000), por lo que, la modificación de los niveles de colesterol promovida por cada isoforma de apoE puede repercutir sobre el proceso de neurodegeneración durante la EA.

La asociación de apoE a lípidos es esencial no sólo para el transporte de éstos, sino también para la actividad biológica que apoE desempeña, concretamente la unión a fosfolípidos, ya que no es tan determinante la asociación a colesterol (Hayashi et al., 2007). Esto favorece que apoE se encuentre en forma monomérica lo que, en términos de actividad por su unión a receptores, la hace más activa frente a los oligómeros (Perugini et al., 2000). Uno de los lípidos con los que apoE se asocia es el DMPC, donde apoE interacciona con las cabezas polares del fosfolípido, que promueve un cambio en su conformación (Hatters et al., 2006; Innerarity et al., 1986; Peters-Libeu et al., 2006). Por ello, y con el fin de reproducir lo más fielmente posible la actividad biológica de las apoEs, hemos tratado de unir apoE a vesículas sintéticas de DMPC, manteniendo una proporción 1:2,5 (proteína:DMPC) ya que, como otro estudio ha revelado, bajo esta proporción no queda apoE libre de lípidos (Yamamoto and Ryan, 2006). Sin embargo, esto podría depender de la isoforma, ya que las diferencias estructurales del dominio C-terminal entre apoE2 y apoE4 también repercuten en su afinidad por el DMPC (Segall et al., 2002) aunque esto en el presente trabajo no se ha comprobado. Aun así, esta lipidación exógena implica que pueda existir una fracción de lípido libre en la solución empleada en el tratamiento de los cultivos celulares, que podría tener un efecto biológico en sí mismo, como

así hemos observado en los ensayos de internalización de IGF-I por las células endoteliales, donde el DMPC ejerce un fuerte efecto inhibitorio. Esto nos llevó a estudiar el efecto de las proteínas recombinantes de apoE sin lipidar y se encontró que, bajo esta condición, apoE muestra la misma actividad biológica que en la solución con complejos de DMPC, por lo que el efecto observado del DMPC no está enmascarando el que tiene la propia apoE. Además, este resultado nos hizo cuestionar la necesidad de lipidar la apoE recombinante de forma exógena para que sea activa. Ya que existen numerosos trabajos donde apoE sin unir a lípidos, aunque no sea su forma fisiológica y pierda cierta actividad respecto a su forma lipidada, también puede producir un efecto biológico por afinidad a algunos tipos de receptores (Castellano et al., 2011; Deane et al., 2008; Narita et al., 2002; Nathan et al., 2002; Ruiz et al., 2005), lo que se haya en contraposición a los estudios que sugieren que la unión a lípidos es imprescindible para su actividad (Hayashi et al., 2007; Innerarity et al., 1986; Matsuo et al., 2011; Saito et al., 2001). Por otro lado, cabe la posibilidad de que la apoE recombinante que añadimos en el medio de cultivo se una de manera espontánea a los lípidos presentes, debido a su elevada afinidad por ABCA1 y ABCG1 (Huang et al., 2006) ya que, una pequeña proporción de lipidación es suficiente para que muestre actividad biológica (DeMattos et al., 1998). Por todo ello, se decidió cambiar la metodología experimental y trabajar con las formas recombinantes de apoE sin lipidar.

5.1. APOE MODULA LA ENTRADA DE IGF-I AL CEREBRO Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El metabolismo lipídico relacionado con apoE en la periferia no sucede exactamente de la misma manera que en el SNC, pero los cambios a nivel periférico sí tienen consecuencias directas en el cerebro (Baker-Nigh et al., 2016). Así mismo, el tipo de dieta consumida repercute directamente sobre el aclaramiento hepático de lipoproteínas a través de sus receptores y de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) de la superficie celular y, por tanto, sobre los niveles lipídicos plasmáticos (Foley et al., 2013; Kiran et al., 2017). Por ello, se puede producir una marcada dislipidemia tras el consumo prolongado de dietas poco saludables en animales de experimentación y humanos (Eskelinen et al., 2008; Farr et al., 2008; Kothari et al., 2017; Petrov et al., 2015) donde cada isoforma humana de apoE juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis lipídica, ya que difieren radicalmente en su actividad (Getz and Reardon, 2009; Heeren et al., 2006; Yamauchi et al., 1999).

Por su parte, la obesidad es el principal factor de riesgo en el desarrollo de DMII y la deficiencia en la señalización de insulina/IGF-I en el cerebro podría estar detrás de los

problemas cognitivos que pueden aparecer asociados a esta enfermedad (Kothari et al., 2017; McNay et al., 2010; Petrov et al., 2015). Basándose en este papel de la insulina, como estrategia para paliar las consecuencias cognitivas que produce la obesidad, se intenta incrementar farmacológicamente la sensibilidad periférica a insulina (Pathan et al., 2008; Ryan et al., 2006; Tanokashira et al., 2018) o bien su administración directa en el SNC (Benedict et al., 2004; McNay et al., 2010; Park et al., 2000).

Dado que el papel de la insulina ha sido más estudiado que el del IGF-I, se ha evidenciado que durante la obesidad, en concreto se produce una deficiencia en el transporte de insulina periférica al interior del cerebro (Heni et al., 2014; Kaiyala et al., 2000). Nosotros también, hemos observado que la llegada de IGF-I al interior del cerebro se ve disminuida en ratones con sobrepeso e intolerancia a la glucosa periférica, tras el consumo prolongado de una dieta con alto contenido en grasa. Este efecto de la dieta sobre la señalización de IGF-I en el cerebro ya lo habíamos observado previamente (Dietrich et al., 2007), y actualmente proponemos que la apoE periférica, cuya concentración se encuentra muy elevada en respuesta a este tipo de dieta, juega un papel fundamental. Pensamos que la apoE circulante, en concreto apoE4, estaría mediando este efecto que las dietas poco saludables ejercen, impidiendo que el IGF-I de la periferia entre al cerebro a través de la BBB. Así, mediante los estudios *in vitro*, hemos podido determinar que la isoforma humana apoE4 ejerce un mayor efecto impidiendo la internalización de IGF-I en células endoteliales, por lo que, trasladando estos resultados a la población humana, el isotipo de apoE expresado por cada individuo podría determinar el impacto de su estilo de vida sobre la repercusión en el SNC. De esta forma, los individuos que expresen la isoforma apoE4 podrían tener exacerbada la deficiencia en la entrada de IGF-I al cerebro desde la periferia, frente a los sujetos que expresen las otras isoformas de apoE, estableciéndose así un posible mecanismo que conectaría la resistencia a insulina e IGF-I en el cerebro en individuos con obesidad y DMII, y el incremento a la predisposición que esto conlleva al desarrollo de la EA dependiendo del genotipo de apoE.

Una forma fisiológica de estimular la sensibilización a insulina e IGF-I es realizando ejercicio físico. El IGF-I además de ser un potente ansiolítico, puede producir una mejoría en los procesos cognitivos, tal como demuestran muchos estudios en los que se reduce el riesgo de demencia en humanos y animales de experimentación tras ejercicio (Chang et al., 2012; Gates et al., 2013; Heyn et al., 2004; Karssemeijer et al., 2019; Kramer et al., 2006; Radak et al., 2006; Trejo et al., 2008). Este beneficio podría estar relacionado con una mayor acción de la insulina e IGF-I a nivel cerebral, ya que existe una implicación directa del IGF-I favoreciendo el aumento de la plasticidad sináptica y neurogénesis hipocampal, que están detrás del efecto del ejercicio

físico sobre los procesos cognitivos (Carro et al., 2000; Ding et al., 2006; Trejo et al., 2008). Del mismo modo, el enriquecimiento ambiental (sin ejercicio) es un paradigma experimental que, tras la exposición durante largos periodos de tiempo, genera efectos similares a los que ejerce el ejercicio físico (Lestaevel et al., 2014; Llorens-Martín et al., 2010; van Praag et al., 2000), aunque no se activan exactamente las mismas rutas (Olson et al., 2006). Sin embargo, un protocolo agudo de enriquecimiento ambiental durante 2 horas es suficiente para inducir el transporte de IGF-I al interior del cerebro, con el consecuente incremento en la fosforilación del IGF-IR (Trueba-Saiz et al., 2017). Por todo ello, en nuestro caso, el enriquecimiento ambiental es una buena aproximación experimental para inducir la entrada de IGF-I al cerebro, y estudiar el impacto de la dieta con alto contenido en grasa sobre este mecanismo concreto, ya que no influye el sobrepeso que se ha inducido en los animales, como podría ocurrir si se los somete a ejercicio físico.

En línea con la idea que nosotros proponemos, en un trabajo empleando ratones que expresan la isoforma humana apoE4, la estimulación por enriquecimiento ambiental no favorece la neurogénesis (Levi and Michaelson, 2007). Además, en humanos que expresan apoE4, el riesgo de sufrir demencia es superior, aun realizando ejercicio físico (Podewils et al., 2005) por lo que ambas observaciones podrían ser un reflejo, a largo plazo, de la deficiencia en la señalización por IGF-I e insulina como consecuencia de una menor llegada al cerebro, influida por la acción de apoE.

Además, nuestros estudios *in vitro* apuntan a que, las células endoteliales son más sensibles al efecto de apoE sobre la internalización de IGF-I que el plexo coroideo. Esta especificidad dependiente del tipo celular, podría deberse, por un lado, a que las células endoteliales presentan unas propiedades concretas que les permite realizar sus funciones de barrera (Ballabh et al., 2004) al encontrarse en contacto directo con la sangre, lo que las podría hacer más sensibles al efecto del apoE circulante. Sin embargo, tal observación también podría deberse a una limitación experimental, ya que las células epiteliales del plexo coroideo expresan más apoE que el endotelio, en condiciones fisiológicas (Xu et al., 2006). Por lo que la propia producción endógena de apoE por las células del plexo, podría generar que estas células estén menos sensibilizadas al efecto de la apoE añadida exógenamente, a pesar de haber eliminado la endógena liberada al medio previamente a la realización de los ensayos. Esta idea se refiere a que, en un trabajo previo del laboratorio, se encontró que las dietas con elevado contenido en grasa impiden la entrada de IGF-I también a través del plexo coroideo, por lo que bajo condiciones experimentales en las que la concentración de apoE se encuentra

muy elevada, sí se observa un efecto de inhibición en la entrada de IGF-I también a través del plexo coroideo (Dietrich et al., 2007).

Profundizando en los mecanismos por los cuales apoE podría estar interfiriendo con la llegada de IGF-I/insulina al cerebro, se ha encontrado que el IGF-IR se puede asociar con otros receptores, entre ellos el LRP1 y megalina, que produce cambios en la internalización de IGF-I (Carro, 2005; Dietrich et al., 2007; Nishijima et al., 2010; Vieira et al., 2015). A este respecto, nosotros hemos encontrado que cada isoforma de apoE podría modular la asociación entre LRP1 e IGF-IR y repercutir sobre la internalización de IGF-I, aunque se trata de una observación pendiente de confirmar.

Así mismo, no hay que olvidar la posible implicación de los HSPG como mediadores de los efectos de apoE en la internalización de IGF-I. Así, se ha propuesto que la apoE puede modificar la actividad de algunos factores de crecimiento al competir con ellos en la unión a los HSPG presentes en la matriz extracelular (Mahley, 1988). Los HSPG tienen una alta afinidad por las lipoproteínas que contienen apoE, de manera dependiente de la isoforma ($\text{apoE2} > \text{apoE3} > \text{apoE4}$), y ejercen un papel fundamental en el aclaramiento de éstas. De forma que pueden colaborar con los receptores específicos al retener a las lipoproteínas en la superficie celular, pero también pueden internalizarlas de manera independiente a otros receptores (Ji et al., 1998). Hay que destacar que los HSPG también tienen afinidad por ciertos tipos de IGFBPs, tal como IGFBP-3 y 5 (Arai et al., 1994), al igual que ocurre con los receptores de lipoproteínas como el LRP1 que puede unir IGFBP-3 (Carro, 2005; Nishijima et al., 2010). Esta afinidad de IGFBPs por los HSPG podría facilitar las acciones celulares del IGF-I. Por otro lado, existe una relación entre la diabetes y los HSPG hepáticos, aunque se han encontrado resultados discrepantes en estudios con modelos animales de diabetes. Así la composición de los HSPG está alterada en ratas diabéticas (Kjellen et al., 1983), mientras que no se han encontrado afectados los HSPG bajo esta condición en otro estudio realizado en ratón (Bishop et al., 2010). Las diferencias encontradas entre estos trabajos, podría deberse a que emplean modelos de diabetes diferentes además de la especie animal. Igualmente, son de gran importancia los hallazgos de Zhao et al., 2017, que demuestran que apoE se puede unir directamente a los receptores de insulina. Al parecer, apoE4 lo hace con mayor avidez que apoE3, por lo que no podemos descartar que tenga afinidad también por el IGF-IR dada la gran homología de éste con el receptor de insulina.

Por tanto, apoE podría mediar su efecto sobre la internalización celular de IGF-I compitiendo con él o con las IGFBPs en su unión a diferentes tipos de receptores, o bien promoviendo cambios conformacionales y/o de biodisponibilidad de los receptores a nivel de

membrana, donde cada isoforma humana de apoE, que presenta distinta afinidad por los receptores, marca importantes diferencias. Sin embargo, habría que seguir investigando en busca de esclarecer los mecanismos específicos. Quizá empleando modelos *in vivo* o modelos *in vitro* más complejos donde participen todas las células que componen la BBB, ya que en nuestro caso, los experimentos *in vitro* se encuentran muy simplificados con el uso de cultivos de células endoteliales solamente.

A su vez, dado que el cerebro es uno de los órganos con mayor producción de apoE, donde actúa localmente, no solo despierta interés el papel que juega esta proteína en el metabolismo lipídico en la periferia y su repercusión sobre el SNC, sino también sus funciones específicas dentro del cerebro. En este sentido, hemos encontrado que en presencia de apoE4 se reduce la fosforilación inducida por IGF-I de ERK1/2 y AKT en astrocitos *in vitro*, aunque no lo inhibe por completo, de manera similar a lo que han publicado otros autores en cultivos de neuronas bajo la estimulación con insulina (Chan et al., 2015; Ong et al., 2014; Zhao et al., 2017).

Es interesante, que el reciclaje intracelular de apoE con la isoforma apoE4 se encuentra comprometido, ya que se retiene intracelularmente en mayor medida que las otras isoformas de apoE (Heeren et al., 2006). Esto repercute en una disfunción del sistema endosomal (Nuriel et al., 2017; Peng et al., 2019; Prasad and Rao, 2018) que hace que también se ralentice el reciclaje de receptores, al quedar secuestrados en compartimentos intracelulares durante más tiempo, y por tanto, disminuye su disponibilidad en la membrana plasmática. Mediante este mecanismo, apoE4 modifica la función de receptores tan relevantes como son el NMDA y AMPA (Chen et al., 2010), y también en el caso del receptor de insulina (Zhao et al., 2017).

De nuevo, esto nos hace pensar que apoE4 atenuando la señalización intracelular de IGF-I en las células cerebrales, podría actuar por los mismos mecanismos por los que impide su internalización. Por un lado, apoE4 podría estar compitiendo directamente con el IGF-I en su unión al receptor y además, tras el proceso de endocitosis del complejo ligando-receptor, requerido para el inicio de la señalización intracelular por IGF-I, durante el reciclaje del IGF-IR, apoE4 promoviendo una disfunción del sistema endosomal podría promover una disminución de la cantidad de receptores disponibles. Mientras que apoE2, que por sus características estructurales tiene menos afinidad por los receptores, podría competir en menor medida con IGF-I y quizá por ello, encontramos que apoE2 tampoco interfiere con la señalización del IGF-I.

La activación de la ruta de señalización PI3K-AKT por IGF-I es una de las mejores caracterizadas. A través de ella, se induce la supervivencia y proliferación celular inhibiendo la apoptosis, que es una de las principales acciones del IGF-I (Bondy and Cheng, 2004; van der

Heide et al., 2006). Esta ruta puede modularse por LRP1 al modificar la actividad del receptor de insulina (Fuentealba et al., 2009). También apoE, a través del LRP1, puede ejercer un papel neuroprotector por inhibición de la quinasa pro-apoptótica GSK3 β . Sin embargo, lo hace a través de una ruta independiente de PI3K-AKT, en la que están implicadas otras quinasas como PKC δ , y donde apoE4 muestra menor neuroprotección en comparación con otras isoformas de apoE (Hayashi et al., 2007). Igualmente, GSK3 es inhibida por Reelina a través de los receptores ApoER2 y VLDL (Beffert et al., 2002; Hiesberger et al., 1999) y apoE4 interfiere con esta señalización de Reelina (Chen et al., 2010). A su vez, otros receptores de lipoproteínas como megalina se encuentran implicados mediando la supervivencia celular por mecanismos independientes de GSK3 (Gomes et al., 2016). Esto está en línea con nuestros resultados en los ensayos de viabilidad celular ya que el IGF-I mantiene la supervivencia celular incluso en presencia de apoE4, ya que esta isoforma no es capaz de inhibir por completo la señalización de IGF-I a través de la fosforilación de AKT. Además, como otros investigadores han descrito, se podría dar una activación de esta misma ruta por apoE2 de forma independiente a IGF-I, actuando ambos sinérgicamente. Según nuestras observaciones apoE2 también estaría actuando a través de la ruta PI3K-AKT, ya que vemos un ligero incremento en la fosforilación de AKT bajo la estimulación de IGF-I y apoE2 en los astrocitos.

Por su parte, la viabilidad de las células del plexo coroideo no se ven muy afectadas por la presencia de apoE. Esto se corresponde con que, efectivamente, en este tipo celular la señalización por IGF-I no se encuentra modulada por la presencia de apoE, coincidiendo con lo observado previamente en los ensayos de internalización de IGF-I.

En conjunto, nuestros resultados indican que la apoE periférica impide la llegada de IGF-I al interior del cerebro por interferir con su internalización. La isoforma apoE4 ejerce un mayor efecto inhibitor sobre la entrada de IGF-I, comparado con apoE2, y esto repercute directamente en su señalización intracelular, pero no en su función protectora. Aunque bajo nuestras condiciones experimentales *in vitro* hemos utilizado concentraciones de ambos ligandos similares a las que se encuentran en el SNC en condiciones fisiológicas, es importante trasladar nuestras observaciones al contexto del envejecimiento, o a patologías en las que se produzca una resistencia a insulina/IGF-I como la DMII y la EA, donde el escenario cambia radicalmente ya que la concentración de IGF-I en el SNC puede ser distinta, lo que quizás establecería otras condiciones en los niveles relativos de IGF-I y apoE. Además, el propio genotipo de apoE podría marcar también una diferencia en los niveles de ésta (Baker-Nigh et al., 2016). Por lo que, en estas situaciones patológicas, puede verse favorecida la acción de apoE, mientras que la de IGF-I se vería debilitada, con lo que, la inhibición que apoE4 ejerce

sobre la señalización de IGF-I, ya debilitada, podría entonces repercutir en sus funciones celulares. En este sentido, se ha propuesto que la contribución de apoE4 en la fisiopatología de la EA, podría deberse tanto a una pérdida de la función protectora, que sí presentan otras isoformas (Hayashi et al., 2007), como a una ganancia de función toxica debido a que apoE4 es más susceptible al procesamiento proteolítico, y los fragmentos del C-terminal truncados son citotóxicos (Chang et al., 2005; Harris et al., 2003; Huang et al., 2001). Aunque en los ensayos de viabilidad celular nosotros no observamos una elevada toxicidad inducida por esta isoforma, si vemos que IGF-I podría paliar la acción de apoE4, por lo que igualmente bajo una condición en que disminuya la sensibilidad a IGF-I, se podría producir un incremento de la muerte celular promovido por apoE4.

Resultados en esta línea se han encontrado en el caso de la insulina. En ratones que expresan isoformas humanas de apoE, a lo largo del envejecimiento, se acentúan las deficiencias en la señalización de insulina cerebral en los ratones que expresan apoE4 en comparación con la isoforma apoE3 (Ong et al., 2014). Esto también ocurre con las dietas con alto contenido en grasa, proponiéndose un efecto sinérgico entre apoE4, obesidad y envejecimiento sobre el deterioro de la señalización por insulina (Zhao et al., 2017), y que a la vista de nuestros resultados es extensible al IGF-I. Así mismo, en estadíos tempranos de pacientes con EA, aparecen estas deficiencias en la señalización por insulina, y al igual que en el caso de la obesidad, la administración intranasal de insulina mejora los síntomas cognitivos asociados a la enfermedad en los individuos que no expresan apoE4 (Claxton et al., 2015; Reger et al., 2008).

5.2. LA MODULACIÓN POR IGF-I SOBRE EL METABOLISMO DE A β DEPENDE DEL CONTEXTO DE APOE

La proteína APP puede interaccionar intracelularmente con otras proteínas de membrana con residuos NPxY a través de la proteína adaptadora FE65 (Borg et al., 1996). Esta asociación se produce con los receptores de lipoproteínas (Gill et al., 2015; Pietrzik, 2004; Trommsdorff et al., 1998; Yang et al., 2013) y a la luz de nuestros resultados, también con el IGF-IR, el cual presenta residuos NPxY en su estructura (Hsu et al., 1994). No obstante, no podemos descartar que en la asociación intervengan otros dominios ya que, inesperadamente, esta asociación entre el IGF-IR y APP, la encontramos mayoritariamente en astrocitos a pesar de que el APP es una proteína altamente expresada en neuronas (Sisodia et al., 2018), pero donde parece que no se encuentra tan asociada al IGF-IR. La forma mayoritaria del APP expresado en las neuronas es APP₆₉₅ que pierde el dominio KPI, una región extracelular con la que puede

interaccionar con otras proteínas, presente en las otras isoformas del APP más largas (APP₇₅₁ y APP₇₇₀), y que son mayoritarias en las células gliales (Belyaev et al., 2010) por lo que, previsiblemente, este dominio podría estar implicado en la asociación entre el IGF-IR y el APP.

A través de la asociación entre APP e IGF-IR en astrocitos, y quizás también en neuronas, el IGF-I podría modular su procesamiento, ya que observamos que el IGF-I favorece la producción de sAPP, aunque este efecto no es estadísticamente significativo. Asimismo, otros autores han mostrado resultados similares, en una línea celular derivada de un feocromocitoma (Zhang et al., 2011) y neuroblastoma (Adlerz et al., 2007), en los que el IGF-I favorece el procesamiento del APP, demostrándose en estos estudios que este procesamiento está favorecido por α -secretasa ya que se reduce la expresión de BACE1, por ambas vías canónicas de señalización, PI3K-AKT y MAPK-ERK, mientras que los niveles de la proteína APP no se ven modificados. Igualmente, la activación de la vía PI3K se ha descrito como una ruta clave en el procesamiento no amiloidogénico del APP (Phiel et al., 2003) inducida por la insulina (Solano et al., 2000), aunque el efecto de IGF-I es más potente (Adlerz et al., 2007). Apoyando esto, en los ratones deficientes para IGF-I (Carro et al., 2002), o en condiciones de deficiencia en la señalización de IGF-I/insulina, como en la obesidad, la producción de A β aumenta (Petrov et al., 2015; Sharma et al., 2008). En contraposición, otros estudios demuestran que la activación de la vía PI3K a través del IGF-IR favorece la producción de A β (Costantini et al., 2006; Freude et al., 2009; Gontier et al., 2015) y en un artículo reciente, la activación de una PKC atípica por insulina, que también puede activar el IGF-I, favorece la producción de A β (Sajan et al., 2018) atribuyéndose como una consecuencia de la hiperinsulinemia. Sin embargo, ésta es una condición que se produce en la periferia en situaciones patológicas de resistencia a insulina como DMII y EA, por lo que las observaciones de estos últimos autores podrían ser relevantes como mecanismo periférico, pero no en el SNC.

Entre la discrepancia de resultados publicados hasta el momento, nosotros no hemos encontrado cambios en la expresión génica de APP, sino en su procesamiento, y nuestros resultados en cultivos primarios son similares a aquellos realizados en líneas celulares y animales, en los que IGF-I favorecería el procesamiento del APP (Adlerz et al., 2007; Carro et al., 2002; Sharma et al., 2008; Zhang et al., 2011), observado por el incremento en la producción de sAPP. Quedando aún por determinar si hay una preferencia por la acción de α -secretasa en favor de β -secretasa, lo cual es de vital importancia en el contexto de la EA. No obstante, en nuestras observaciones, el contexto de apoE también repercute sobre el papel de IGF-I. Así, apoE2 favorece la producción de sAPP en mayor medida que apoE4, pero no existe un efecto sinérgico entre apoE2 e IGF-I. Este hallazgo era esperable dado que se ha

relacionado a apoE con la producción de A β , favorecido por la isoforma apoE4 más que por las otras isoformas (Hopkins et al., 2011; Huang et al., 2017; Ye et al., 2005), aunque también existen estudios donde las isoformas humanas de apoE no modifican la producción de A β , sino su aclaramiento (Castellano et al., 2011). Los primeros autores sugieren que apoE4 favorece la asociación de LRP1 con APP y siguiendo esta misma idea, otros autores describen que la asociación de APP con el LRP1 modula su translocación, favoreciéndose su endocitosis y procesamiento por la vía amiloidogénica, por lo que se incrementa la producción de A β (Pietrzik, 2004; Ulery et al., 2000; Yang et al., 2013). En cambio, también existen estudios en los que bloqueando la expresión del LRP1 se modifica el aclaramiento de A β y no su producción (Kanekiyo et al., 2013). En relación con esto, nosotros observamos que apoE podría modular la asociación de LRP1 con otra proteína de membrana como el IGF-IR, aunque no se han obtenido datos concluyentes al respecto por lo que no podemos discutir que esto sea así.

En relación con la idea anteriormente mencionada, acerca de que apoE4 produce que se genere una disfunción del sistema endosoma-lisosoma y previo a la patología iniciada por el A β (Nuriel et al., 2017; Peng et al., 2019). Esta disfunción endosomal es una de las alteraciones encontradas en los pacientes de EA (Cataldo et al., 2000), y la retención de APP en compartimentos intracelulares puede favorecer la actividad de BACE1 y producción de A β (Golde et al., 1992; Vassar et al., 1999). Por otro lado, la retención de apoE en los endosomas tempranos, también se ha relacionado con un posible efecto de apoE como factor de transcripción, ya que los autores proponen que, al retenerse intracelularmente y escapar de la degradación proteolítica, puede llegar al núcleo. Esta acción de apoE actuando directamente en el núcleo, se ha puesto de manifiesto en otro trabajo donde se muestra que apoE puede unirse a elementos reguladores del ADN y modificar la expresión de diferentes genes (Theendakara et al., 2016), entre ellos el APP, cuya transcripción se induce en mayor medida dependiendo de la isoforma (apoE4>apoE3>apoE2) (Huang et al., 2017). A diferencia de esto, nosotros no hemos encontrado cambios sobre la expresión génica de APP por apoE.

Además, el estado de fosforilación de los residuos NPxY y otros residuos fosforilables presentes en el IGF-IR, los receptores de la familia LDL y el APP, o de las proteínas adaptadoras intracelulares asociadas, son determinantes para su translocación (Matsushima et al., 2012; Zlokovic et al., 2010), y pueden modularse por la insulina e IGF-I (Carro, 2005; Gasparini et al., 2001). Nuestros indicios, junto con los controvertidos resultados hallados por otros autores, anima a seguir investigando la modulación de las asociaciones proteicas entre IGF-IR, LRP1 y APP por las diferentes isoformas humanas de apoE e IGF-I, y su implicación sobre la producción de A β . Para ello, nuestro modelo de lesión por isquemia en el animal FIRKO-T, puede ser una

buena herramienta experimental ya que la señalización por el IGF-IR se encuentra bloqueada específicamente en astrocitos, que es el tipo celular en el que mayor interacción entre APP e IGF-IR encontramos, coincidiendo con un mayor efecto de IGF-I sobre el procesamiento del APP. Además, en el contexto de isquemia cerebral, es clave el potente efecto anti-inflamatorio del IGF-I (Bake et al., 2014; Genis et al., 2014), donde además de estar incrementada la expresión de APP, también lo está la de apoE, y muchas de las rutas de señalización que conllevan la producción de A β por la actividad de BACE1, se encuentran hiperactivadas en condiciones proinflamatorias y de estrés (Muche et al., 2017; Zhao et al., 2011). Bajo estas circunstancias, el IGF-I actúa mediante la inhibición de NF- κ B (Fernandez et al., 2007; Lackey et al., 2000; Okubo et al., 1998) y apoE3 también puede inhibir la actividad de NF- κ B a través del LRP1, mientras que apoE4 no lo hace (Bell et al., 2012) y además eleva la producción de citoquinas proinflamatorias (Theendakara et al., 2016). Por su parte, los receptores de lipoproteínas como megalina, son clave como mediadores de neuroprotección en condiciones fisiológicas y de lesión por isquemia (Gomes et al., 2016) y el IGF-I puede modificar la actividad de este receptor (Carro, 2005).

Cuando hemos generado una lesión cerebral por isquemia, los astrocitos que presentan el IGF-IR truncado expresan más APP. Aunque el anticuerpo que hemos empleado está dirigido frente a la región N-terminal de la proteína madura de APP, por lo que no podemos descartar que las diferencias que observamos en la inmunotinción de APP se deban a cambios en el estado de procesamiento del APP. Ya que, efectivamente, los experimentos *in vitro* muestran que el procesamiento de APP puede estar modificado por la propia actividad del IGF-IR con el que interacciona, y habría que continuar explorando las consecuencias de este entorno en la producción de A β . Así mismo, también se incrementa la expresión de apoE, por lo que contando además con animales que expresen las isoformas humanas de apoE, se obtendrían datos de la implicación de cada isoforma, ya que también se ha relacionado la resistencia a IGF-I/insulina y el genotipo de apoE con el riesgo a sufrir isquemia (Alberts et al., 1995; Luchsinger et al., 2001; Slioter et al., 1997).

El procesamiento del APP es un proceso fisiológico necesario para el correcto funcionamiento de las funciones celulares. Sin embargo, la sobreproducción de A β puede llevar a su acumulación y toxicidad si no es eliminado apropiadamente. Se ha propuesto que la ineficacia en el aclaramiento y degradación de A β contribuye a su acumulación y a la patología en la EA, en mayor medida que su sobreproducción (Selkoe, 2001). Hemos observado que el A β 40 interfiere con la internalización de IGF-I, como ya habíamos publicado previamente (Trueba-Saiz et al., 2017) y también lo hace con su señalización intracelular. Esto coincide con

lo observado sobre su interferencia sobre la señalización de la insulina, ya que A β genera muerte celular por apoptosis, al inhibir la ruta de supervivencia PI3K-AKT (Lee et al., 2009), y que es rescatada por IGF-I (Wei et al., 2002). Este efecto de A β 40 podría deberse a una unión directa con el IGF-IR ya que se ha referido que, al menos en estado monomérico, A β 40 es capaz de activar a este receptor en células neuronales *in vitro*, lo que se ha relacionado con las funciones protectoras de los monómeros de A β 40 (Zimbone et al., 2018).

El sentido de la elección del A β 40 para nuestros ensayos en preferencia del A β 42 u otros tamaños del péptido, así como su forma soluble en favor de un estado de mayor agregación como las formas fibrilares, se debe a que el A β 40 es uno de los productos mayoritarios tras el procesamiento del APP (Vassar et al., 1999) al que se ha atribuido efectos neurotóxicos (Hartley et al., 1999) en sus formas más simples de agregación como son los oligómeros solubles, a diferencia del efecto neuroprotector propuesto en el caso de los monómeros. Además este estado más simple de agregación, previo a su acumulación, es mayoritario en los estados más tempranos de la EA (Bitan et al., 2002).

En el SNC, el IGF-I favorece el aclaramiento de A β por el plexo coroideo a través de megalina (Carro, 2005), mientras que a nivel periférico la insulina favorece el aclaramiento de A β a través del LRP1 hepático (Tamaki et al., 2007), aunque también se ha propuesto que impide su aclaramiento del cerebro (Shiiki, 2004). Sin embargo, en otros trabajos, el mecanismo propuesto por el cual la insulina favorece la acumulación de A β en el cerebro implica la inhibición proteolítica de A β , por competencia en su unión a IDE, más que su aclaramiento por transporte o endocitosis (Farris et al., 2003; Kurochkin and Goto, 1994).

Según nuestros resultados, el IGF-I favorece la internalización de A β 40 soluble por hepatocitos y astrocitos, pero no por la microglía, lo cual es sorprendente ya que son las principales células fagocíticas del SNC e internalizan A β de manera similar a como lo hacen los astrocitos (Mulder et al., 2014; Yeh et al., 2016). Estos resultados podrían deberse al estado de agregación del A β 40 empleado en nuestros ensayos, ya que los astrocitos internalizan preferentemente las formas más simples de A β (monómeros y pequeños oligómeros), que se correspondería con el estado del A β 40 soluble empleado aquí, mientras que la microglía tiene preferencia por las formas más fibrilares e insolubles (Mulder et al., 2014; Nielsen et al., 2010).

Así mismo, los animales con sobrepeso presentan mayor aclaramiento hepático del A β 40 periférico. Presumiblemente, esto es debido a un efecto mediado por IGF-I, cuyos niveles plasmáticos están elevados, como consecuencia de la resistencia a insulina generada por la obesidad. Estos animales también presentan una elevada concentración de apoE periférica

que podría estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el IGF-I, pero, al igual que las observaciones en los hepatocitos *in vitro*, parece que prevalece el efecto de IGF-I. Respecto a esto, hay que mencionar que en nuestro estudio los ratones están expresando la apoE murina endógena, con una secuencia de aminoácidos que difiere de cualquiera de las isoformas humanas. Respecto a los aminoácidos que son críticos para su funcionalidad, la apoE murina tiene Arg112, Arg158 y Glu255, lo que, en cuanto a secuencia, la haría más semejante a apoE4. En cambio, no tiene la Arg61, un aminoácido imprescindible, junto con la Arg112, para que se den las interacciones entre los dominios que caracterizan a apoE4 y determinan su estructura. Esta Arg61 en la apoE murina se encuentra ocupada por Thr61, lo que impide que se den interacciones entre dominios, por lo que la apoE murina, en términos de estructura y actividad, se comporta de manera más similar a la isoforma nativa en humanos apoE3 (Mahley et al., 2009), a pesar de que su secuencia comparta similitudes con apoE4. Otra diferencia importante, se da en el residuo 194, un sitio de glicosilación ocupado por una Asn en la apoE murina que hace que esta isoforma no se encuentre sializada, a diferencia de las isoformas humanas (Weisgraber, 1994). Además, parece que la apoE murina es más amiloidogénica que las apoE humanas ya que bloqueando su expresión, también desciende la acumulación de A β (Bales et al., 1997). A pesar de todo ello, en nuestro modelo el IGF-I favorece el aclaramiento de A β 40. Esto indicaría que, aunque la resistencia a IGF-I/insulina periférica tenga efectos perjudiciales en el SNC, en lo relevante al metabolismo de A β , al disminuir su aclaramiento por internalización celular (Carro et al., 2006), si se pudiera de alguna forma favorecer la salida del A β a través de la BBB al torrente sanguíneo, se podría aclarar más eficientemente a través del hígado en situaciones de obesidad. Esta posibilidad quedaría por explorar y habría que considerar también los recientes hallazgos de Sajan et al., 2018, en los que, la hiperinsulinemia conduce a una sobreproducción de A β .

Se ha propuesto la implicación del receptor LRP1, entre otros receptores de su misma familia, como mediadores de la internalización de A β . Para ello, actuaría por mecanismos de endocitosis comunes a los que median el aclaramiento de apoE (Basak et al., 2012; Kounnas et al., 1995; Liu et al., 2017; Nazer et al., 2008; Verghese et al., 2013), y por lo tanto, apoE podría en teoría competir con A β en su unión a LRP1. De esta manera, las isoformas de apoE podrían inhibir la captura de A β por astrocitos y microglía, en mayor o menor medida, dependiendo de la afinidad de cada isoforma por los receptores (Mulder et al., 2014). Nosotros además observamos que apoE interfiere sobre la acción de IGF-I en este proceso, de manera isoforma dependiente y en todos los tipos celulares estudiados. ApoE4 es la que ejerce un papel inhibitorio más potente sobre el efecto de IGF-I favoreciendo la internalización del A β 40, en

astrocitos y hepatocitos, respecto al de apoE2 cuya inhibición sobre IGF-I sólo se da en astrocitos, probablemente porque en los hepatocitos la dosis de IGF-I empleada ha sido mayor.

En cambio, el aclaramiento por transcitosis de A β en células endoteliales lo vemos levemente disminuido por IGF-I, mientras que junto a apoE2 se restauran los niveles, de manera similar a los basales. Este resultado resulta llamativo e inesperado ya que previamente hemos publicado que en el plexo coroideo el IGF-I favorece la endocitosis de A β (Carro et al., 2002). Aunque el proceso de transcitosis es diferente a la endocitosis, y existe controversia sobre si por ejemplo el receptor LRP1 media la transcitosis de A β (Bell et al., 2007; Pflanzner et al., 2011; Zlokovic et al., 2010) o sólo su endocitosis (Bachmeier et al., 2014; Candela et al., 2015; Nazer et al., 2008). Además, el transporte de A β entre la sangre y el cerebro podría ser bidireccional, y los receptores RAGE son determinantes para la entrada de A β desde la sangre al cerebro (Herring et al., 2008; Pflanzner et al., 2011). A su vez, en modelos animales de EA, el enriquecimiento ambiental favorece la angiogénesis, incrementando la expresión de LRP1, disminuyendo la de RAGE e incrementando los niveles de proteínas chaperonas de A β como apoE (Herring et al., 2008), que produce una reducción en la cantidad y acumulación de A β (Lazarov et al., 2005). Por todo ello, y con los datos con los que contamos no podemos descartar que nuestras mediciones del A β 40 transportado, puedan estar modificadas por un intercambio constante de A β entre el interior y el exterior del inserto de nuestro sistema *in vitro*. Sería necesario continuar este estudio en más profundidad para conocer, tanto los receptores implicados en este mecanismo, como sus dinámicas temporales para hacer una interpretación de los resultados certera, ya que cada receptor tiene cinéticas de endocitosis muy diferentes (Deane et al., 2008).

Existen numerosos trabajos que proponen que la apoE interviene en la internalización de A β al actuar como chaperona de éste, lo que facilita su aclaramiento dependiendo de la isoforma. Así, apoE4 presenta menos afinidad por A β , sobre todo cuando el péptido se encuentra en su forma soluble (Castellano et al., 2011; Cramer et al., 2012; Deane et al., 2008; Gylys et al., 2003; Hori et al., 2015; LaDu et al., 1995; Strittmatter et al., 1993; Tokuda et al., 2000; Yang et al., 1997). En cambio, también se ha propuesto que la interacción de apoE con A β facilita su acumulación (Bales et al., 1997; Hu et al., 2015; Pankiewicz et al., 2014), y que apoE no tiene afinidad por A β en condiciones fisiológicas (Verghese et al., 2013). Sin embargo, es plausible la idea de que apoE pueda secuestrar a A β con mayor afinidad dependiendo de la isoforma en nuestras condiciones *in vitro*, ya que observamos que apoE2 elimina el efecto inhibitorio producido por A β 40 sobre la internalización de IGF-I en células endoteliales, a pesar

de la dosis suprafisiológica empleada de A β 40, mientras que apoE4 no lo hace. En el caso de la insulina, se ha observado que A β impide la unión a su receptor (Chan et al., 2015; Xie et al., 2002) y que apoE también se puede unir a los receptores de insulina (Chan et al., 2015; Zhao et al., 2017). En el caso del IGF-IR, no podemos descartar que pueda ocurrir lo mismo, de hecho el A β también se une al IGF-IR (Zimbone et al., 2018), De esta forma, el rescate por apoE2 sobre la disminución en la internalización de IGF-I ejercida por A β se puede deber al efecto ejercido por apoE al secuestrar o desplazar al A β . Este proceso también podría estar modificando los mecanismos de transcitosis de A β por las células endoteliales.

En el trabajo realizado por Petrov et al., 2015 comparan los efectos de la dieta con alto contenido en grasa sobre la señalización por insulina, en un modelo de EA en ratón, a la edad en la que los animales ya muestran alteraciones en la memoria y presentan depósitos de A β . La importancia de sus hallazgos reside en que, además de demostrar que la deficiencia de insulina en el SNC inducida por la dieta con alto contenido en grasa produce alteraciones en su señalización hipocampal, similares a los que se dan en los animales modelo de EA, como ya en otros estudios se había manifestado, destaca que los problemas cognitivos que se originan son independientes de los depósitos de A β . Por ello, los autores sugieren que la insulina podría jugar un papel fundamental mediando directamente funciones cognitivas, donde la toxicidad inducida por el A β generado en la EA, solo estaría potenciando un proceso patológico ya iniciado por la deficiencia en la señalización por insulina. Esta teoría ya se había propuesto previamente (Carro and Torres-Aleman, 2004), y está de acuerdo con el conjunto de nuestros resultados empleando el modelo de obesidad en ratón y los ensayos *in vitro*, y que nos ha permitido validar nuestra hipótesis. Así, la apoE interfiere con la entrada de IGF-I al cerebro y su señalización, lo que sugeriría que factores de riesgo como la obesidad, favorece una deficiencia en la señalización del IGF-I en el cerebro. A su vez, y al igual que proponen estos autores para la insulina, esta deficiencia en la señalización intracelular por IGF-I estaría detrás de las alteraciones celulares, por las que se inicia un proceso patológico que se manifiesta en problemas cognitivos, que se dan en patologías en las que existe una desensibilización del SNC a IGF-I/insulina tales como la DM o durante el transcurso normal del envejecimiento. Pero además, se afecta directamente al metabolismo de A β . De esta forma la deficiencia en el SNC de IGF-I puede estar reduciendo el procesamiento del APP, pero además se estaría disminuyendo su eliminación ya que la internalización por astrocitos estaría también reducida. Añadiendo además, que ser portador de la isoforma humana apoE4 sería especialmente perjudicial interfiriendo con las acciones del IGF-I a todos estos niveles en mayor medida que la isoforma humana apoE2.

5.3. IGF-I ESTIMULA LA LIBERACIÓN DE APOE POR ASTROCITOS

La síntesis y liberación de apoE, así como su estado de lipidación, se encuentran reguladas por muchos factores con la finalidad de mantener la homeostasis lipídica. Factores tróficos como el FGF-I estimula la síntesis y liberación de apoE y colesterol por astrocitos a través de la activación de PI3K-AKT, mientras que su expresión a nivel de mRNA no se ve modificada por esta ruta (Ito et al., 2007). En contraposición, las citoquinas proinflamatorias, especialmente TNF- α , inhiben su producción (Starck et al., 2000). Por su parte, la expresión de apoE sí está estimulada por la expresión y activación de los receptores LXR hepáticos, que se incrementa tras la estimulación de la vía MAPK-ERK, y que también regula la síntesis de colesterol (Lu et al., 2009). Esta estimulación aumenta bajo situaciones de lesión o estrés celular, como mecanismo compensatorio frente al daño. De la misma manera, encontramos que otro factor trófico como el IGF-I favorece la liberación de apoE por astrocitos, aunque nosotros no observamos cambios estadísticamente significativos sobre su expresión génica. No descartamos que estén implicadas las mismas rutas de señalización descritas, ya que en lesión por isquemia en los animales FIRKO-T, en los que el IGF-IR no señala en los astrocitos, se encuentra un incremento de apoE mayoritariamente en neuronas que tienen su señalización por IGF-IR intacta. Así, las neuronas en animales FIRKO-T, que no tienen alterada la señalización por el IGF-IR, pueden responder al daño inducido por la isquemia incrementando la síntesis de apoE, entre otras proteínas. Aunque este incremento también es observable en los astrocitos de estos ratones mutantes, probablemente bajo la acción de otros factores o incluso el propio IGF-I actuando a través de otras células. Hay que tener en cuenta que, durante la lesión isquémica, se encuentra exacerbada la producción de factores tróficos para favorecer la reparación, y el colesterol juega un papel crítico para que sea posible la neuro-regeneración (Mauch et al., 2001; Poirier et al., 1993; Posse De Chaves et al., 2000). Respecto a esto, la cantidad de colesterol proporcionado por los astrocitos se ve disminuida por apoE4 frente a la expresión de otras isoformas de apoE (Gong et al., 2002) aunque algunos autores han propuesto que el apoE presente en las neuronas puede ser directamente sintetizado *in situ* (Xu et al., 1999), y no solo es transportado desde los astrocitos, como inicialmente se pensaba. Por otra parte, la insulina puede modificar la expresión de genes implicados en la síntesis del colesterol (Suzuki et al., 2010), por lo que, no sería de extrañar, que esta función pudiera estar también compartida por el IGF-I, ya que ambas hormonas pueden ejercer acciones similares. La insulina también favorece el estado de lipidación de apoE (Hanson et al., 2013), el cual cambia radicalmente en las diferentes isoformas de apoE. La apoE4 es la isoforma que menos afinidad por lípidos presenta (Hu et al., 2015), lo que a su vez repercute

en su afinidad por A β (Castellano et al., 2011; Hanson et al., 2013; Hu et al., 2015; Strittmatter et al., 1993; Tokuda et al., 2000), tal como observamos en nuestros experimentos *in vitro*.

Anteriormente, en otros trabajos publicados por el laboratorio, ya se ha descrito que el IGF-I favorece la eliminación de A β incrementando la producción de otras proteínas chaperonas de A β como albúmina, transtirretina y apoJ, entre otros mecanismos (Carro and Torres-Aleman, 2004; Carro et al., 2002), por lo que no sorprende que hayamos encontrado que IGF-I también favorezca la secreción de apoE. Ya que apoE está tan relacionada con la patología de la EA, probablemente a través de su interacción con A β , se ha descrito que modificando farmacológicamente sus niveles o su estado de lipidación se altera el metabolismo de A β (Hanson et al., 2013; Riddell et al., 2008). Así, aumentando la concentración de apoE, descienden los niveles de A β y las placas amiloide en modelos de EA (Castellano et al., 2011; Cramer et al., 2012; Fitz et al., 2010; Riddell et al., 2008) y en humanos (Hanson et al., 2013). No obstante, también existen datos que hacen cuestionar si aumentar la concentración de apoE puede ser una buena estrategia terapéutica en la EA, ya que las estatinas, ampliamente empleadas como tratamiento para la hipercolesterolemia, y que inhiben la liberación de apoE (Naidu et al., 2002) reducen la producción de A β (Fassbender et al., 2001; Simons et al., 1998) y algunos pacientes que siguen esta terapia están protegidos frente al desarrollo de demencia y EA, mientras que en otros casos aumentan su riesgo (revisado en Suzuki et al., 2010). Respecto a esto, ya hemos descrito que la influencia de cada isoforma de apoE es diferente en lo relativo a la producción y eliminación de A β . A su vez, existen evidencias de que la producción de A β se ve favorecida por el procesamiento de APP en los rafts lipídicos (Cheng et al., 2007; Fuentealba et al., 2007; Matsushima et al., 2012; Yang et al., 2013), que son regiones específicas de la membrana plasmática muy enriquecidas en colesterol, por lo que modificando los niveles de colesterol se inducen cambios en la localización del APP, así como de sus enzimas proteolíticas, las secretasas, lo que afecta directamente a su procesamiento. Por tanto, esto también podría estar relacionado con que las diferentes isoformas de apoE presenten diferentes eficiencias regulando el colesterol (Yamauchi et al., 1999), por lo que los efectos discordantes referidos, tras la modificación de los niveles de apoE, pueden radicar en el isotipo de apoE de cada individuo sobre el que las estatinas estén actuando. Del mismo modo, el IGF-I en el SNC, al inducir la producción de apoE por los astrocitos, o si modificara su estado de lipidación como hace la insulina lo cual sería interesante analizar, podría tener diferente repercusión sobre el aclaramiento de A β y/o su producción, dependiendo de este contexto de apoE. Así, si un individuo expresa apoE2, el IGF-I, al incrementar su liberación, estaría favoreciendo efectos protectores, mientras que, si se expresa apoE4, su inducción por

parte de IGF-I estaría potenciando efectos patológicos atribuidos a esta isoforma y también se estaría favoreciendo una interferencia con la propia señalización y función de IGF-I, lo que sugiere que puede que exista una regulación cruzada muy compleja entre ambas proteínas.

Por otra parte, también se ha propuesto que, en condiciones de dislipidemia periférica, los triglicéridos o metabolitos derivados de la síntesis de colesterol pueden atravesar la barrera hematoencefálica y participar de forma directa en la aparición de los déficits cognitivos (Dietrich et al., 2007; Farr et al., 2008; Salameh et al., 2016; Sharma et al., 2008). Por lo que el IGF-I en el SNC, al estimular la secreción de apoE, podría favorecer que se aclaren más eficazmente las lipoproteínas y por tanto reducir esta cantidad de triglicéridos y metabolitos lipídicos del cerebro, mitigando así la repercusión perjudicial de éstos. De nuevo, el genotipo de apoE es determinante para este proceso, ya que cada isoforma tiene una preferencia diferente por lípidos y diferentes tipos de receptores, que puede generar diferencias en el catabolismo lipídico (Hu et al., 2015; Ruiz et al., 2005; Yamauchi et al., 1999).

Así mismo, dentro del SNC la procedencia celular de apoE podría marcar también diferencias a nivel postraducciona que se reflejen en su funcionalidad (Mahley et al., 2009; Pitas et al., 1987; Xu et al., 1999), por lo que realizar estudios complementarios, similares a los que nosotros hemos realizado pero con las isoformas de apoE fisiológicas producidas por cada tipo celular en el SNC podrían aportar datos relevantes.

Nuestro estudio nos ha permitido hallar diferencias a nivel celular en cuanto a la especificidad de las funciones de apoE y su interferencia con las funciones del IGF-I, así como la repercusión que tiene en el metabolismo del A β , que es tan relevante, en la patología de la EA.

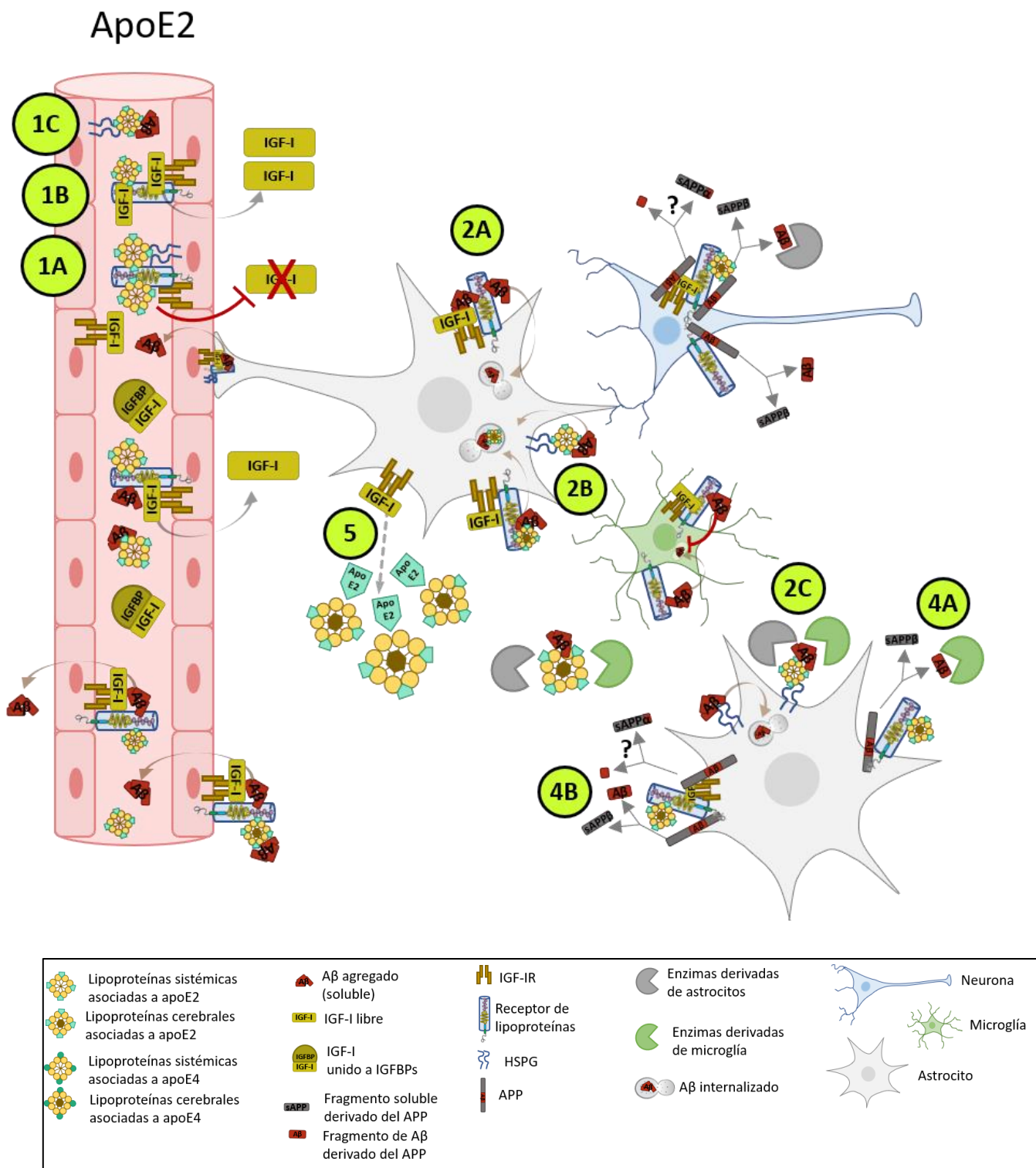


Figura 35. Modelo sobre las interacciones entre IGF-I y apoE2.

Esquema de un modelo que proponemos sobre las posibles interacciones que se producen a nivel periférico (1A-C) y en el interior del cerebro (2 A-C; 3 A,B; 4), con la implicación de cada una de las principales proteínas que participan: receptores de lipoproteínas, HSPG, IGF-IR y APP; sus ligandos: IGF-I, lipoproteínas asociadas a apoE y péptido Aβ; y los principales mecanismos estudiados: entrada del IGF-I periférico al cerebro (1), eliminación (2) y producción de Aβ (4) y producción de apoE por astrocitos (5).

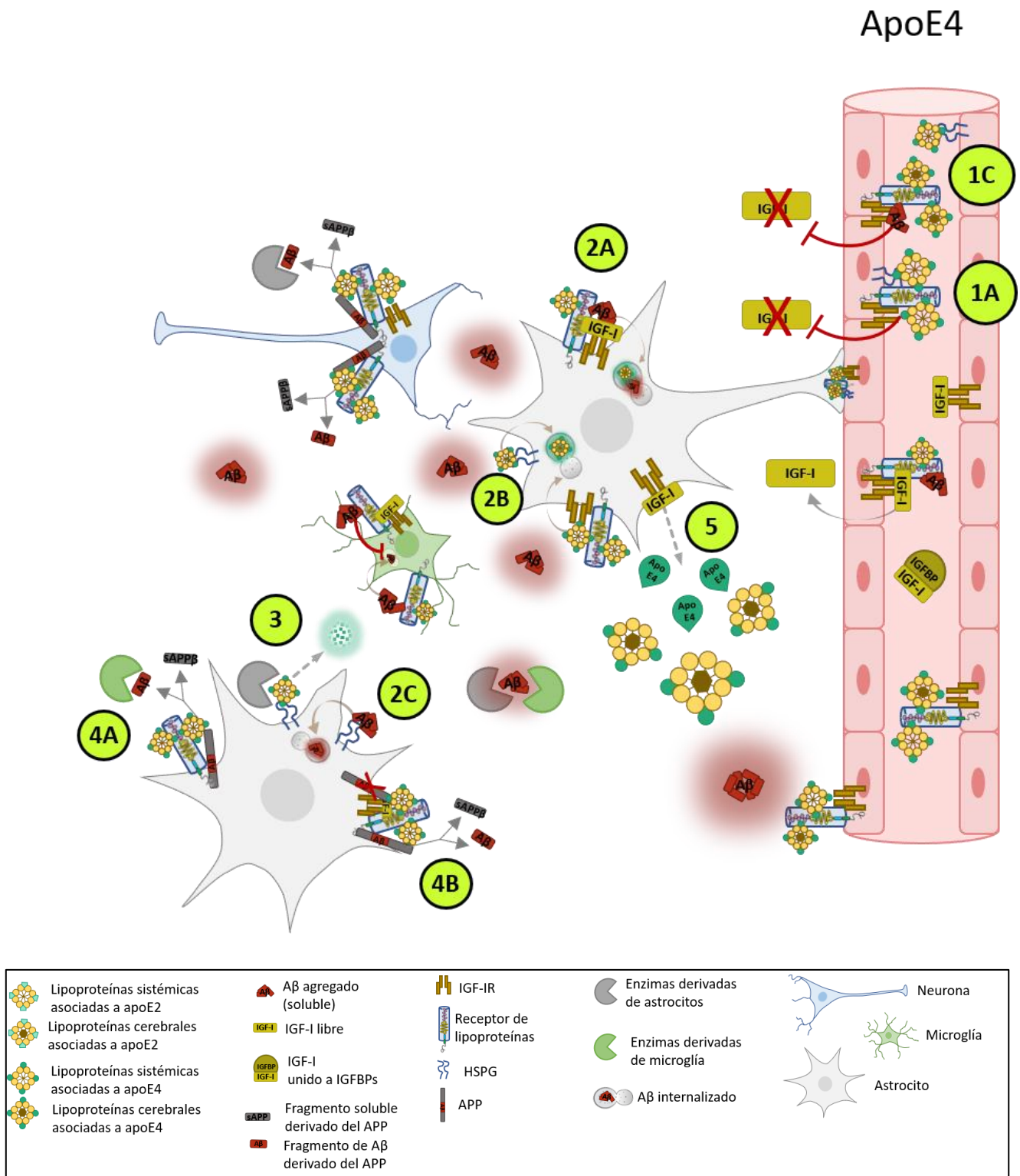


Figura 36. Modelo sobre las interacciones entre IGF-I y apoE4.

Esquema de un modelo que proponemos sobre las posibles interacciones que se producen a nivel periférico (1A-C) y en el interior del cerebro (2 A-C; 3 A,B; 4), con la implicación de cada una de las principales proteínas que participan: receptores de lipoproteínas, HSPG, IGF-IR y APP; sus ligandos: IGF-I, lipoproteínas asociadas a apoE y péptido Aβ; y los principales mecanismos estudiados: entrada del IGF-I periférico al cerebro (1), eliminación (2) y producción de Aβ (4) y producción de apoE por astrocitos (5).

En la figuras 35 y 36 se representa un modelo en el que se describen los mecanismos en los que se producen interacciones entre IGF-I y apoE, según lo que sospechamos que podría estar ocurriendo, a partir de la interpretación de todos los resultados obtenidos y datos aportados por otros autores recogidos de la bibliografía. Según esto, la presencia de apoE en la circulación central estaría compitiendo con el IGF-I en su unión a los receptores de lipoproteínas e IGF-IR (Fig. 35 y 36, 1A). Dada la baja afinidad que tiene apoE2 por los receptores, bajo esta situación el IGF-I se uniría a los sitios que no son ocupados por apoE2 (Fig. 35, 1B), por lo que podría entrar al interior del SNC mediando su transporte el IGF-IR y los receptores de lipoproteínas. A diferencia de lo que ocurriría con el fenotipo apoE4, que al presentar mayor afinidad por los receptores, desplazaría al IGF-I, impidiendo así su entrada al interior del cerebro (Fig. 36, 1A). Sin descartar que además pueda sumarse que la cantidad de receptores disponibles en la membrana es menor porque apoE4 promueva un disfunción del reciclado de receptores (esta situación no se representa en el modelo).

Un tercer ligando común de estos receptores sería el péptido A β (Fig. 35 y 36, 1C), que también competiría con apoE e IGF-I en su unión a los receptores, considerándose aquí, además, la supuesta afinidad que puede tener apoE2 en favor de apoE4 por unirse al propio péptido. Por lo que, con un fenotipo apoE2 (Fig. 35, 1C), las lipoproteínas estarían secuestrando al A β , y de nuevo debido a la baja afinidad de apoE2 por los receptores, el complejo apoE2-A β en lugar de ocupar sitios susceptibles de ser ocupados por el IGF-I, se dirigirían a otros destinos como puede ser su retención en la superficie celular por los HSPG y posterior degradación enzimática (Fig. 35, 1C). En comparativa, bajo el fenotipo de apoE4, cuya asociación con A β es menos estable, éste queda libre y se dirigiría a los receptores, compitiendo ahora también el péptido A β con apoE4 e IGF-I, por tanto, el IGF-I tendría mayor impedimento para unirse a sus receptores y eso se traduciría en una menor llegada de IGF-I al interior del cerebro (Fig. 36, 1C).

Respecto al efecto del IGF-I en el SNC y su modulación por apoE, por el mismo fundamento basado en las diferencias en las afinidades por los receptores de ambas isoformas, apoE2 estaría interfiriendo en menor medida que apoE4, en la unión del IGF-I a sus receptores y su señalización. Ya que IGF-I, promueve la internalización de A β por astrocitos (Fig. 35 y 36, 2A-C), apoE2 interferiría menos que apoE4 sobre este efecto, ya sea mediante la internalización celular mediada por receptores (Fig. 35, 2A) o con la colaboración de los HSPG (Fig. 35, 2B), los cuales a su vez quizá también faciliten la actividad enzimática (IDE, neprilisina) (Fig. 35, 2C). Por su parte, en estos mismos mecanismos influidos por la presencia de apoE4, se estaría impidiendo la función de IGF-I, al ocupar apoE4 los sitios de unión de IGF-I y A β en los

receptores (Fig. 36, 2A), además apoE4 no atraería al A β a los HSPG presentes en la superficie celular (Fig. 36, 2B) aunque el A β podría unirse directamente a ellos (Fig. 36, 2C), y además dadas las características estructurales de apoE4 que la hace más susceptible a la degradación enzimática podría ser sustrato de las mismas enzimas que degradan el A β , produciéndose dos efectos perjudiciales, por un lado un descenso en la eliminación del péptido, y por otro lado la formación de fragmentos de apoE4 tóxicos (Fig. 36, 3) y favoreciendo la acumulación de A β .

Por último, dado que IGF-I y apoE2 favorecen la producción de sAPP, pero no de manera sinérgica, esto nos lleva a suponer que la asociación entre los receptores de lipoproteínas y APP a nivel intracelular, estaría favoreciendo que el APP se internalice y por tanto se incremente su procesamiento (previsiblemente por β -secretasas, incrementándose entonces la fracción soluble sAPP β) que se estaría estimulando tanto por apoE2 como por apoE4 (Fig. 35 y 36, 4A) pero en mayor medida por apoE2. En cambio, cuando el IGF-IR se asocia con los receptores de lipoproteínas impediría la interacción de éstos con el APP, asociándose el APP con el IGF-IR, previsiblemente extracelularmente. Así el IGF-IR, ralentizaría la internalización del APP, ya que la endocitosis del IGF-IR activo sería mas lenta que la de los LDLRs y esto estaría favoreciendo el procesamiento, previsiblemente por α -secretasas, incrementándose entonces la fracción soluble sAPP α . Además la propia actividad del IGF-IR mediante la activación de quinasas, podría favorecer la inhibición de β -secretasas, por lo que a la vez que aumenta sAPP α un tipo de procesamiento disminuiría sAPP β , tras la activación del IGF-IR. Pero la acción de este receptor sólo sería posible bajo un fenotipo de apoE2 en el que la región extracelular de los receptores se encuentra menos ocupada (Fig. 35, 4B) en comparación con la situación en la que apoE4 sea la isoforma que expresada (Fig. 36, 4B). Este procesamiento en el APP podría estar ocurriendo en mayor medida a nivel de astrocitos, pero también minoritariamente en las neuronas.

Finalmente se representa el efecto de IGF-I induciendo la liberación de apoE (Fig. 35 y 36, 5), que contribuiría a acentuar las diferencias ejercidas por apoE2 y apoE4 modulando la propia actividad del IGF-I, produciéndose una regulación cruzada.

5.5. PERSPECTIVAS FUTURAS

En la presente tesis se demuestra la conexión que existe entre el fenotipo de apoE y la señalización por IGF-I en el cerebro. Postulamos que el estado de resistencia al IGF-I del cerebro es un suceso patológico temprano en el desarrollo de la EA, que conlleva procesos patológicos que aceleran el curso de la enfermedad y se ve acentuado por el fenotipo apoE4 junto con otros factores de riesgo que dependen del estilo de vida. Sin embargo, han quedado aspectos pendientes de elucidar y es necesario profundizar más en esta relación para conocer con precisión su alcance y su impacto en la EA.

Una de las principales limitaciones de nuestro estudio es que la gran parte de los análisis se han realizado empleando sistemas *in vitro* de células en cultivo. La ventaja de esta metodología es que permite reducir el uso de animales de experimentación y hallar mecanismos celulares concretos. En cambio, su limitación se halla en que se pierde la información derivada de la interconexión entre los diferentes tipos celulares presentes en el cerebro y que es crucial para durante el desarrollo de las funciones fisiológicas. Por lo que, en nuestra opinión, una vez hallada la modulación entre apoE e IGF-I célula-específica, realizar estudios empleando animales de experimentación podría confirmar lo que aquí se postula y elucidar relaciones entre los diferentes tipos celulares más complejas que las que aquí se han determinado.

Gracias al uso de ratones modificados genéticamente se pueden modelizar muchas de las enfermedades que ocurren en humanos. Este es el caso de los ratones que de forma constitutiva expresan cada una de las isoformas humanas de apoE (Taconic), que sería muy útil emplear para estudiar en profundidad el impacto de cada isoforma de apoE periférica sobre la entrada de IGF-I al cerebro. Dado la particularidad de que apoE no cruza la barrera hematoencefálica y se expresa localmente en el cerebro, también es muy ventajoso contar con ratones que expresan apoE bajo el promotor de GFAP (*The Jackson Laboratory*) para así estudiar los mecanismos en los que apoE interviene modulando al IGF-I y que tienen lugar en el SNC.

No obstante, consideramos que detallar los receptores implicados en cada proceso de internalización y su regulación, por ejemplo, mediante la asociación con otras proteínas es crítico para describir los mecanismos concretos y para este aspecto continuar con los modelos celulares *in vitro* pueden ser de mayor utilidad. Otra de las ventajas de esta herramienta experimental, es que los modelos celulares son fácilmente manipulables a nivel molecular, por lo que, para confirmar la implicación de un receptor en concreto, se puede modificar su

expresión (a la alta o a la baja, dependiendo del caso), y bajo esta situación, estudiar si se altera el mecanismo con el que se le relacione, por ejemplo en los mecanismos de internalización y respuesta celular al IGF-I, o para la eliminación del péptido A β .

Por tanto, quizá sería interesante comenzar desgranando a nivel celular, que tipos concretos de entre todos los receptores de lipoproteínas (LRP1, apoE2, VLDL, LDL, SorLa, megalina) son determinantes en cada uno de los procesos, si participan los mismos receptores o son diferentes en el caso de la internalización de IGF-I y A β . Una vez conocido esto, determinar si existen diferencias marcadas por cada isoforma de apoE en su afinidad por el receptor o receptores implicados, y ver sus asociaciones con otras proteínas de membrana, así como la repercusión de estas asociaciones sobre la regulación de sus funciones. En otras palabras, consistiría en realizar experimentos de interacción de proteínas similares a los presentados en el apartado 4.3. Ampliando el estudio a la interacción entre el IGF-IR y otros receptores de la familia de los LDLR, y no sólo centrado en el LRP1, que escogimos por ser uno de los mas estudiados y para el que ya otros grupos han demostrado su implicación en los mecanismos que nos interesaba estudiar, pero cuyas funciones no son exclusivas, ya que también se ha demostrado la implicación de otros receptores de su familia en procesos similares. Así mismo, sería revelador determinar la posición del APP en estas interacciones, es decir, si la asociación entre IGF-IR y aquellos receptores de lipoproteínas implicados determina la co-asociación de cualquiera de ellos con el APP. Ya que como se representa en las figuras 35 y 36, el IGF-IR, APP y LRP1 podrían formar complejos proteicos independientes, esto es, cuando APP se encuentra interaccionando en la membrana plasmática con el IGF-IR, no lo hace con el LRP1 y viceversa, pero esto por el momento es sólo una especulación pendiente de contrastar. Estos experimentos podrían realizarse mediante la técnica de PLA, por la cual también se puede cuantificar la modulación de la interacción por los diferentes ligandos de los receptores (apoEs e IGF-I). Si bien, esta técnica presenta la limitación que sólo permite visualizar dos proteínas a la vez, por lo que en el caso de los estudios que además incluyan al APP, quizá la mejor elección es realizar co-inmunoprecipitación de proteínas.

Una vez determinadas las interacciones, y siguiendo con los ensayos *in vitro*, continuar estudiando de forma exhaustiva cómo repercuten sobre el procesamiento del APP y su modulación por apoE e IGF-I puede ser altamente interesante. Esto se puede determinar mediante el análisis de diferentes fragmentos y ensayos de actividad enzimática de α -secretasa, y de forma complementaria de β -secretasa. Ya que, si como se ha postulado en la bibliografía, apoE4 puede modificar la actividad endocítica, que a su vez también se puede encontrar determinado por cada tipo de receptor implicado, esto puede tener una gran

repercusión en la producción de A β . En este sentido, en lo que respecta al papel del IGF-I, tras la activación del IGF-IR en nuestras observaciones se favorece la actividad de las secretas, y la bibliografía está repleta de datos contradictorios a cerca de si la vía de PI3K-AKT o MAPK-ERK favorece la acción de BACE1 o en cambio la inhibe. Por ello, conocer la identidad concreta de las secretasas que están actuando sobre el APP y si se encuentran estimuladas o mitigadas por IGF-I, mediante los ensayos de actividad, es determinante para conocer la importancia del incremento en el procesamiento que hemos observado inducido por IGF-I. Así mismo, ya que una alteración de la actividad endocítica, puede repercutir directamente sobre la eliminación celular de A β sería interesante estudiar la localización subcelular del A β internalizado en presencia de IGF-I y cada isoforma de apoE, para determinar si en alguna de estas condiciones se favorece su retención en compartimentos endosomales, acción que en la literatura se atribuye a apoE4, o bien si alguna condición favorece su degradación intracelular.

Una vez que se cuente con las primeras aproximaciones *in vitro*, a cerca de los tipos de proteínas que participan, sus interacciones, y regulación en presencia de ligandos potenciales (IGF-I y ApoE), así como el tipo celular más influyente, sería el momento de trasladar el estudio a modelos más complejos con el uso de los ratones modificados genéticamente que expresen cada isoformas de apoE, sobre expresen el péptido A β (APP/PS1, con el que ya contamos en el laboratorio), o con el ratón FIRKO-T lesionado, que ya hemos validado como herramienta.

Finalmente, un capítulo que hemos comenzado a explorar con resultados llamativos es la estimulación de la producción de apoE por astrocitos promovida por IGF-I. Dado que esto está tan sólo iniciado, serían muchos los aspectos en los que se podría profundizar. Quizá lo primordial podría ser tratar de analizar la función fisiológica de esta estimulación, es decir, analizar, cómo a través de la estimulación de la producción de apoE, el IGF-I modifica el metabolismo lipídico, empezando por hacer un estudio de la composición lipídica celular, analizando la proporción de cada tipo de lípido presente bajo la influencia de IGF-I y cada fenotipo de apoE. Ya que, como otros estudios han apuntado, el propio fenotipo de apoE *per se*, marca diferencias en el metabolismo lipídico debido a las características específicas que presenta cada isoforma de apoE, por lo que esto podría ser de nuevo un punto de interacción trascendental para la fisiología celular, entre ambos sistemas. Esto nos hace hipotetizar, y de nuevo es una especulación pendiente de contrastar, que el efecto que observamos por parte del IGF-I estimulando la producción de apoE podría ser dual y tener diferentes consecuencias si impacta sobre apoE2 o sobre apoE4, y por ello consideramos que quizá es la primera aproximación que hay que esclarecer.

Aunque en esta tesis doctoral, se han obtenido resultados novedosos en el tema de estudio, queda abierto a numerosas opciones por las que continuar avanzando, por lo que lo anteriormente expuesto se trata sólo algunas de consideraciones personales, derivadas de las interpretaciones realizadas a partir de los resultados obtenidos, lo que no hace que queden excluidas otras posibles interpretaciones. En paralelo se ha propuesto algunas opciones sobre la metodología para abordarlo, considerando aquella más convencional y que ya se ha manejado, pero con el perfeccionamiento y optimización de las técnicas científicas podría emplearse metodología más novedosa y precisa.

Conclusiones



1. De entre las isoformas de apoE testadas, sólo apoE4 inhibe la internalización de IGF-I por células endoteliales en cultivo. En sujetos portadores de apoE4, este efecto podría contribuir a la acción que tienen las dietas con alto contenido en grasa sobre la deficiencia de entrada del IGF-I al cerebro desde la periferia.
2. La apoE4 mitiga la señalización intracelular de IGF-I *in vitro* por células del SNC y las neuronas son el tipo celular que muestra mayor sensibilidad sobre la acción de apoE. Así mismo, existe una regulación cruzada en el cerebro por la cual el IGF-I, a su vez, promueve la liberación de apoE por astrocitos.
3. La supervivencia celular promovida por IGF-I *in vitro* no se encuentra comprometida en presencia de ninguna isoforma humana de apoE.
4. El IGF-IR y la proteína APP se encuentran asociadas en astrocitos, donde el IGF-I junto a apoE2 favorece la producción de sAPP en mayor medida que con apoE4.
5. ApoE2 es protector frente al efecto inhibitorio de A β 40 sobre la internalización de IGF-I en células endoteliales en cultivo, mientras que apoE4 no lo es.
6. IGF-I estimula la internalización de A β 40 por astrocitos y hepatocitos, y este efecto es inhibido por apoE4 en mayor medida que por apoE2. De manera opuesta IGF-I inhibe la internalización de A β 40 en células de microglía. Así mismo, los animales con sobrepeso y elevados niveles de IGF-I periféricos aclaran el A β 40 plasmático a través del hígado de manera más eficaz que los animales controles, previsiblemente mediado por el efecto de IGF-I sobre los hepatocitos y a pesar de presentar elevados niveles de apoE plasmáticos.
7. La isquemia cerebral, como modelo de lesión para inducir la expresión de APP y apoE es una posible herramienta para el estudio del papel de IGF-IR en la patología de Alzheimer, tal como se ha podido comprobar en los ratones FIRKO-T.

Referencias



- Adlerz, L., Holback, S., Multhaup, G., and Iverfeldt, K. (2007). IGF-1-induced processing of the amyloid precursor protein family is mediated by different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 10203–10209.
- Agostinho, P., Pliássova, A., Oliveira, C.R., and Cunha, R.A. (2015). Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 45, 329–347.
- Alberts, M.J., Graffagnino, C., McClenny, C., DeLong, D., Strittmatter, W., Saunders, A.M., and Roses, A.D. (1995). ApoE genotype and survival from intracerebral haemorrhage. *Lancet* (London, England) 346, 575.
- Aleksic, T., Chitnis, M.M., Perestenko, O. V., Gao, S., Thomas, P.H., Turner, G.D., Protheroe, A.S., Howarth, M., and Macaulay, V.M. (2010). Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Res.* 70, 6412–6419.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr f Psychiatr. u Psych-Gerichtl Med.*
- Anderson, R., Barnes, J.C., Bliss, T.V.P., Cain, D.P., Cambon, K., Davies, H.A., Errington, M.L., Fellows, L.A., Gray, R.A., Hoh, T., et al. (1998). Behavioural, physiological and morphological analysis of a line of apolipoprotein E knockout mouse. *Neuroscience* 85, 93–110.
- Andreasen, N., Sjögren, M., and Blennow, K. (2003). CSF markers for Alzheimer's disease: Total tau, phospho-tau and A β 42. *World J. Biol. Psychiatry* 4, 147–155.
- Arai, T., Parker, A., Busby, W., and Clemmons, D.R. (1994). Heparin, heparan sulfate, and dermatan sulfate regulate formation of the insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein complexes. *J. Biol. Chem.* 269, 20388–20393.
- Von Arnim, C.A.F., Kinoshita, A., Peltan, I.D., Tangredi, M.M., Herl, L., Lee, B.M., Spoelgen, R., Hshieh, T.T., Ranganathan, S., Battey, F.D., et al. (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel β -secretase (BACE1) substrate. *J. Biol. Chem.* 280, 17777–17785.
- Arnold, S.E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S.L., Koenig, A.M., Wang, H.Y., Ahima, R.S., Craft, S., Gandy, S., Buettner, C., Stoeckel, L.E., et al. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 168–181.
- Authier, F., Kouach, M., and Briand, G. (2005). Endosomal proteolysis of insulin-like growth factor-I at its C-terminal D-domain by cathepsin B. *FEBS Lett.* 579, 4309–4316.

- Bachmeier, C., Shackleton, B., Ojo, J., Paris, D., Mullan, M., and Crawford, F. (2014). Apolipoprotein E Isoform-Specific Effects on Lipoprotein Receptor Processing. *NeuroMolecular Med.* *16*, 686–696.
- Bake, S., Selvamani, A., Cherry, J., and Sohrabji, F. (2014). Blood brain barrier and neuroinflammation are critical targets of IGF-1-mediated neuroprotection in stroke for middle-aged female rats. *PLoS One* *9*, e91427.
- Baker-Nigh, A.T., Mawuenyega, K.G., Bollinger, J.G., Ovod, V., Kasten, T., Franklin, E.E., Liao, F., Jiang, H., Holtzman, D., Cairns, N.J., et al. (2016). Human Central Nervous System (CNS) apoE isoforms are increased by age, differentially altered by amyloidosis, and relative amounts reversed in the CNS compared with plasma. *J. Biol. Chem.* *291*, 27204–27218.
- Balda, M.S., and Matter, K. (2007). Size-selective assessment of tight junction paracellular permeability using fluorescently labelled dextrans.
- Baldini, S., Restani, L., Baroncelli, L., Coltelli, M., Franco, R., Cenni, M.C., Maffei, L., and Berardi, N. (2013). Enriched Early Life Experiences Reduce Adult Anxiety-Like Behavior in Rats: A Role for Insulin-Like Growth Factor 1. *J. Neurosci.* *33*, 11715–11723.
- Bales, K.R., Verina, T., Dodel, R.C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., Hyslop, P., Johnstone, E.M., Little, S.P., Cummins, D.J., et al. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nat. Genet.* *17*, 263–264.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview. *Neurobiol. Dis.* *16*, 1–13.
- Basak, J.M., Verghese, P.B., Yoon, H., Kim, J., and Holtzman, D.M. (2012). Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of A β uptake and degradation by astrocytes. *J. Biol. Chem.* *287*, 13959–13971.
- Baxter, R.C. (2015). How IGF-1 activates its receptor. *J. Cell Commun. Signal.* *9*, 87.
- Beffert, U., Aumont, N., Dea, D., Lussier-Cacan, S., Davignon, J., and Poirier, J. (1999). Apolipoprotein E isoform-specific reduction of extracellular amyloid in neuronal cultures. *Mol. Brain Res.* *68*, 181–185.
- Beffert, U., Morfini, G., Bock, H.H., Reyna, H., Brady, S.T., and Herz, J. (2002). Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3 β . *J. Biol. Chem.* *277*, 49958–49964.
- Beffert, U., Weeber, E.J., Durudas, A., Qiu, S., Masiulis, I., Sweatt, J.D., Li, W.P., Adelmann, G.,

- Frotscher, M., Hammer, R.E., et al. (2005). Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 47, 567–579.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 30, 586–623.
- Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman, A.E., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane, R., and Zlokovic, B. V. (2007). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid β -peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 909–918.
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., et al. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* 485, 512–516.
- Belyaev, N.D., Kellett, K.A.B., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β -secretase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 41443–41454.
- Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., Fehm, H.L., Born, J., and Kern, W. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1326–1334.
- Bicker, J., Alves, G., Fortuna, A., and Falcão, A. (2014). Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 409–432.
- Bishop, J.R., Foley, E., Lawrence, R., and Esko, J.D. (2010). Insulin-dependent diabetes mellitus in mice does not alter liver heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 285, 14658–14662.
- Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., and David B. Teplow (2002). Amyloid β -protein (Ab) assembly: Ab40 and Ab42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 330–335.
- Bondy, C.A., and Cheng, C.M. (2004). Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 25–31.
- Bondy, C., Werner, H., Roberts, C.T., and LeRoith, D. (1992). Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: Comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46, 909–923.

- Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6229–6241.
- Boucher, J., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2010). Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 17235–17245.
- Breese, C.R., Ingram, R.L., and Sonntag, W.E. (1991). Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. *Journals Gerontol.* 46.
- Burgdorf, J., Zhang, X.L., Colechio, E.M., Ghoreishi-Haack, N., Gross, A., Kroes, R.A., Stanton, P.K., and Moskal, J.R. (2016). Insulin-like growth factor I produces an antidepressant-like effect and elicits N-methyl-D-aspartate receptor independent long-term potentiation of synaptic transmission in medial prefrontal cortex and hippocampus. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, 1–10.
- Calabria, A.R., Weidenfeller, C., Jones, A.R., de Vries, H.E., and Shusta, E. V. (2006). Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J. Neurochem.* 97, 922–933.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., et al. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: Prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664–670.
- Candela, P., Saint-Pol, J., Kuntz, M., Boucau, M.-C., Lamartiniere, Y., Gosselet, F., and Fenart, L. (2015). In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* 1594, 15–26.
- Carro, E. (2005). Choroid Plexus Megalin Is Involved in Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I. *J. Neurosci.* 25, 10884–10893.
- Carro, E., and Torres-Aleman, I. (2004). The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 127–133.
- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 20, 2926–2933.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., and Torres-Aleman, I. (2002). Serum insulin-like

- growth factor I regulates brain amyloid- β levels. *Nat. Med.* 8, 1390–1397.
- Carro, E., Trejo, J.L., Spuch, C., Bohl, D., Heard, J.M., and Torres-Aleman, I. (2006). Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: New cues into the human disease? *Neurobiol. Aging* 27, 1618–1631.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* 3, 1–23.
- Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Troncoso, J.C., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T., and Nixon, R.A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid β deposition in sporadic alzheimer's disease and down syndrome: Differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* 157, 277–286.
- Chan, E.S., Chen, C., Cole, G.M., and Wong, B.-S. (2015). Differential interaction of Apolipoprotein-E isoforms with insulin receptors modulates brain insulin signaling in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *Sci. Rep.* 5, 1–10.
- Chang, S., Ma, T. r., Miranda, R.D., Balestra, M.E., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2005). Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18694–18699.
- Chang, Y.K., Labban, J.D., Gapin, J.I., and Etnier, J.L. (2012). The effects of acute exercise on cognitive performance: A meta-analysis. *Brain Res.* 1453, 87–101.
- Chen, J., Li, Q., and Wang, J. (2011). Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 14813–14818.
- Chen, Y., Durakoglugil, M.S., Xian, X., and Herz, J. (2010). ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12011–12016.
- Cheng, H., Kulandaivelu S. Vetrivel, Ping Gong, Angèle Parent, and G., and Thinakaran (2007). Mechanisms of Disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease—targeting amyloid precursor protein processing in lipid rafts. *Nat Clin Pr. Neurol* 3, 374–382.
- Chou, C.Y., Jen, W.P., Hsieh, Y.H., Shiao, M.S., and Chang, G.G. (2006). Structural and functional variations in human apolipoprotein E3 and E4. *J. Biol. Chem.* 281, 13333–13344.
- Chu, Q., Diedrich, J.K., Vaughan, J.M., Donaldson, C.J., Nunn, M.F., Lee, K.-F., and Saghatelian,

- A. (2016). HtrA1 Proteolysis of ApoE In Vitro Is Allele Selective. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 9473–9478.
- Claxton, A., Baker, L.D., Hanson, A., Trittschuh, E.H., Cholerton, B., Morgan, A., Callaghan, M., Arbuckle, M., Behl, C., and Craft, S. (2015). Long-acting intranasal insulin detemir improves cognition for adults with mild cognitive impairment or early-stage Alzheimer’s Disease dementia. *J. Alzheimer’s Dis.* 44, 897–906.
- Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.W., Kovacina, K.S., and Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer’s disease is associated with the apolipoprotein E- ϵ 4 allele. *Am. J. Pathol.* 162, 313–319.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science* (80-.). 261, 921–923.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7, 180–184.
- Costantini, C., Scrable, H., and Puglielli, L. (2006). An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid β -peptide generation. *EMBO J.* 25, 1997–2006.
- Craft, S., Baker, L.D., Montine, T.J., Minoshima, S., Watson, G.S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S.R., et al. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* 69, 29–38.
- Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Lee, C.Y.D., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., et al. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 335, 1503–1506.
- Cruchaga, C., Kauwe, J.S.K., Nowotny, P., Bales, K., Pickering, E.H., Mayo, K., Bertelsen, S., Hinrichs, A., Fagan, A.M., Holtzman, D.M., et al. (2012). Cerebrospinal fluid APOE levels: An endophenotype for genetic studies for Alzheimer’s disease. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4558–4571.
- D’Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D.S., Sheldon, M., and Curran, T. (1999). Reelin Is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron* 24, 471–479.
- D’Ercole, A.J., Stiles, A.D., and Underwood, L.E. (1984). Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 935–939.

- Davis, S., and Laroche, S. (2003). What Can Rodent Models Tell Us about Cognitive Decline in Alzheimer's Disease? *Mol. Neurobiol.* 27, 249–276.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B. V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest.* 118, 4002–4013.
- DeMattos, R.B., Curtiss, L.K., and Williams, D.L. (1998). A minimally lipidated form of cell-derived apolipoprotein E exhibits isoform-specific stimulation of neurite outgrowth in the absence of exogenous lipids or lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 273, 4206–4212.
- DeMattos, R.B., Brendza, R.P., Heuser, J.E., Kierson, M., Cirrito, J.R., Fryer, J., Sullivan, P.M., Fagan, A.M., Han, X., and Holtzman, D.M. (2001). Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem. Int.* 39, 415–425.
- Dietrich, M.O., Muller, A., Bolos, M., Carro, E., Perry, M.L., Portela, L. V., Souza, D.O., and Torres-Aleman, I. (2007). Western style diet impairs entrance of blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. *NeuroMolecular Med.* 9, 324–330.
- Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2006). Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140, 823–833.
- Dong, L.-M., Parkin, S., Trakhanov, S.D., Rupp, B., Simmons, T., Arnold, K.S., Newhouse, Y.M., Innerarity, T.L., and Weisgraber, K.H. (1996). Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3, 718–722.
- Dubé, N., and Tremblay, M.L. (2005). Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: From diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, pp. 108–117.
- Elliott, D.A., Weickert, C.S., and Garner, B. (2010). Apolipoproteins in the brain: Implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin. Lipidol.* 5, 555–573.
- Endres, M., Piriz, J., Gertz, K., Harms, C., Meisel, A., Kronenberg, G., and Torres-Aleman, I. (2007). Serum insulin-like growth factor I and ischemic brain injury. *Brain Res.* 1185, 328–335.
- Eskelinen, M.H., Ngandu, T., Helkala, E.L., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H., and Kivipelto, M. (2008). Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: A population-based CAIDE study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 23, 741–747.

- Fagan, A.M., Bu, G., Sun, Y., Daugherty, A., and Holtzman, D.M. (1996). Apolipoprotein E-containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* *271*, 30121–30125.
- Farr, S.A., Yamada, K.A., Butterfield, D.A., Abdul, H.M., Xu, L., Miller, N.E., Banks, W.A., and Morley, J.E. (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* *149*, 2628–2636.
- Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., and Guenette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 4162–4167.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., et al. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A 42 and A 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 5856–5861.
- Fernandez, A.M., and Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 225–239.
- Fernandez, A.M., Fernandez, S., Carrero, P., Garcia-Garcia, M., and Torres-Aleman, I. (2007). Calcineurin in Reactive Astrocytes Plays a Key Role in the Interplay between Proinflammatory and Anti-Inflammatory Signals. *J. Neurosci.* *27*, 8745–8756.
- Fernandez, A.M., Hernandez, E., Guerrero-Gomez, D., Miranda-Vizueté, A., and Torres Aleman, I. (2018). A network of insulin peptides regulate glucose uptake by astrocytes: Potential new druggable targets for brain hypometabolism. *Neuropharmacology* *136*, 216–222.
- Firth, S.M., and Baxter, R.C. (2002). Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocr. Rev.* *23*, 824–854.
- Fitz, N.F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., and Koldamova, R. (2010). Liver X Receptor Agonist Treatment Ameliorates Amyloid Pathology and Memory Deficits Caused by High-Fat Diet in APP23 Mice. *J. Neurosci.* *30*, 6862–6872.
- Foley, E.M., Gordts, P.L.S.M., Stanford, K.I., Gonzales, J.C., Lawrence, R., Stoddard, N., and Esko, J.D. (2013). Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 2065–2074.
- Freude, S., Hettich, M.M., Schumann, C., Stöhr, O., Koch, L., Köhler, C., Udelhoven, M., Leeser,

- U., Müller, M., Kubota, N., et al. (2009). Neuronal IGF-1 resistance reduces A β accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 23, 3315–3324.
- Frieden, C. (2015). ApoE: The role of conserved residues in defining function. *Protein Sci.* 24, 138–144.
- Fuentealba, R.A., Barría, M.I., Lee, J., Cam, J., Araya, C., Escudero, C.A., Inestrosa, N.C., Bronfman, F.C., Bu, G., and Marzolo, M.P. (2007). ApoER2 expression increases A β production while decreasing Amyloid Precursor Protein (APP) endocytosis: Possible role in the partitioning of APP into lipid rafts and in the regulation of γ -secretase activity. *Mol. Neurodegener.* 2, 1–19.
- Fuentealba, R.A., Liu, Q., Kanekiyo, T., Zhang, J., and Bu, G. (2009). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 34045–34053.
- Furihata, T., Kawamatsu, S., Ito, R., Saito, K., Suzuki, S., Kishida, S., Saito, Y., Kamiichi, A., and Chiba, K. (2015). Hydrocortisone enhances the barrier properties of HBMEC/ci β , a brain microvascular endothelial cell line, through mesenchymal-to-endothelial transition-like effects. *Fluids Barriers CNS* 12, 1–15.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: A phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell* 18, 13–24.
- Gasparini, L., Gouras, G.K., Wang, R., Gross, R.S., Beal, M.F., Greengard, P., and Xu, H. (2001). Stimulation of β -Amyloid Precursor Protein Trafficking by Insulin Reduces Intraneuronal β -Amyloid and Requires Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *J. Neurosci.* 21, 2561–2570.
- Gates, N., Fiatarone Singh, M.A., Sachdev, P.S., and Valenzuela, M. (2013). The Effect of Exercise Training on Cognitive Function in Older Adults with Mild Cognitive Impairment: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 21, 1086–1097.
- Genis, L., Dávila, D., Fernandez, S., Pozo-Rodríguez, A., Martínez-Murillo, R., and Torres-Aleman, I. (2014). Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Research* 3, 1–17.
- Getz, G.S., and Reardon, C.A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* 50, S156–S161.
- Gill, R.L., Wang, X., and Tian, F. (2015). A membrane proximal helix in the cytosolic domain of the human APP interacting protein LR11/SorLA deforms liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* -

Biomembr. 1848, 323–328.

Giuffrida, M.L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., et al. (2009). Beta-Amyloid Monomers Are Neuroprotective. *J. Neurosci.* 29, 10582–10587.

Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J., and Younkin, S.G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* (80-.). 255, 728–730.

Gomes, J.R., Nogueira, R.S., Vieira, M., Santos, S.D., Ferraz-Nogueira, J.P., Relvas, J.B., and Saraiva, M.J. (2016). Transthyretin provides trophic support via megalin by promoting neurite outgrowth and neuroprotection in cerebral ischemia. *Cell Death Differ.* 23, 1749–1764.

Gong, J.S., Kobayashi, M., Hayashi, H., Zou, K., Sawamura, N., Fujita, S.C., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2002). Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 277, 29919–29926.

Gontier, G., George, C., Chaker, Z., Holzenberger, M., and Aïd, S. (2015). Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid- β Clearance. *J. Neurosci.* 35, 11500–11513.

Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J., and Herz, J. (2000). Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 275, 25616–25624.

Guan, J., Bennet, L., Gluckman, P.D., and Gunn, A.J. (2003). Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. *Prog. Neurobiol.* 70, 443–462.

Gubbi, S., Quipildor, G.F., Barzilai, N., Huffman, D.M., and Milman, S. (2018). 40 years of IGF1: IGF1: The Jekyll and Hyde of the aging brain. *J. Mol. Endocrinol.* 61, T171–T185.

Gyls, K.H., Fein, J. a., Tan, A.M., and Cole, G.M. (2003). Apolipoprotein E enhances uptake of soluble but not aggregated amyloid- β protein into synaptic terminals. *J. Neurochem.* 84, 1442–1451.

Haan, M.N. (2006). Therapy insight: Type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 159–166.

Hanson, A.J., Bayer-Carter, J.L., Green, P.S., Montine, T.J., Wilkinson, C.W., Baker, L.D., Watson,

- G.S., Bonner, L.M., Callaghan, M., Leverenz, J.B., et al. (2013). Effect of apolipoprotein e genotype and diet on apolipoprotein e lipidation and amyloid peptides randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* 70, 972–980.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (80-.). 256, 184–185.
- Harris, F.M., Brecht, W.J., Xu, Q., Tesseur, I., Kekoni, L., Wyss-Coray, T., Fish, J.D., Masliah, E., Hopkins, P.C., Searce-Levie, K., et al. (2003). Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10966–10971.
- Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* 19, 8876–8884.
- Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., and Weisgraber, K.H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 445–454.
- Hawkes, C.A., Gentleman, S.M., Nicoll, J.A., and Carare, R.O. (2015). Prenatal high-fat diet alters the cerebrovasculature and clearance of β -amyloid in adult offspring. *J. Pathol.* 235, 619–631.
- Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. (2007). Apolipoprotein E-Containing Lipoproteins Protect Neurons from Apoptosis via a Signaling Pathway Involving Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1. *J. Neurosci.* 27, 1933–1941.
- Heeren, J., Beisiegel, U., and Grewal, T. (2006). Apolipoprotein E recycling: Implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 442–448.
- van der Heide, L.P., Ramakers, G.M.J., and Smidt, M.P. (2006). Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Prog. Neurobiol.* 79, 205–221.
- Heni, M., Schöpfer, P., Peter, A., Sartorius, T., Fritsche, A., Synofzik, M., Häring, H.U., Maetzler, W., and Hennige, A.M. (2014). Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetol.* 51, 679–681.
- Hernandez-Garzón, E., Fernandez, A.M., Perez-Alvarez, A., Genis, L., Bascuñana, P., Fernandez de la Rosa, R., Delgado, M., Angel Pozo, M., Moreno, E., McCormick, P.J., et al. (2016). The insulin-like growth factor I receptor regulates glucose transport by astrocytes. *Glia* 64, 1962–1971.

- Herring, A., Yasin, H., Ambrée, O., Sachser, N., Paulus, W., and Keyvani, K. (2008). Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in TgCRND8 mice. *Brain Pathol.* 18, 32–39.
- Heyn, P., Abreu, B.C., and Ottenbacher, K.J. (2004). The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: A meta-analysis. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 85, 1694–1704.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. (1999). Direct Binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and Modulates Tau Phosphorylation. *Neuron* 24, 481–489.
- Hirrlinger, P.G., Scheller, A., Braun, C., Hirrlinger, J., and Kirchhoff, F. (2006). Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. *Glia* 54, 11–20.
- Hoe, H.-S., Pocivavsek, A., Chakraborty, G., Fu, Z., Vicini, S., Ehlers, M.D., and Rebeck, G.W. (2006). Apolipoprotein E receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 3425–3431.
- Hong, M., and Lee, V.M.Y. (1997). Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.* 272, 19547–19553.
- Hopkins, P.C.R., Sáinz-Fuertes, R., and Lovestone, S. (2011). The impact of a novel apolipoprotein e and amyloid- β protein precursor-interacting protein on the production of amyloid- β . *J. Alzheimer's Dis.* 26, 239–253.
- Hori, Y., Hashimoto, T., Nomoto, H., Hyman, B.T., and Iwatsubo, T. (2015). Role of apolipoprotein E in β -amyloidogenesis: Isoform-specific effects on protofibril to fibril conversion of A β in vitro and brain A β deposition in vivo. *J. Biol. Chem.* 290, 15163–15174.
- Hsu, D., Knudson, P.E., Zapf, A., Rolband, G.C., and Olefsky, J.M. (1994). Npxy motif in the insulin-like growth factor-i receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology* 134, 744–750.
- Hu, J., Liu, C.C., Chen, X.F., Zhang, Y.W., Xu, H., and Bu, G. (2015). Opposing effects of viral mediated brain expression of apolipoprotein E2 (apoE2) and apoE4 on apoE lipidation and A β metabolism in apoE4-targeted replacement mice. *Mol. Neurodegener.* 10, 1–11.
- Huang, Y., Liu, X.Q., Wyss-Coray, T., Brecht, W.J., Sanan, D.A., and Mahley, R.W. (2001). Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-

- like intracellular inclusions in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8838–8843.
- Huang, Y.W.A., Zhou, B., Wernig, M., and Südhof, T.C. (2017). ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A β Secretion. *Cell* **168**, 427–441.
- Huang, Z.H., Fitzgerald, M.L., and Mazzone, T. (2006). Distinct cellular loci for the ABCA1-dependent and ABCA1-independent lipid efflux mediated by endogenous apolipoprotein E expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 157–162.
- Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., et al. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **8**, 1–13.
- Iliff, J.J., and Nedergaard, M. (2013). Is There a Cerebral Lymphatic System? *Stroke* **44**, S93–S95.
- Innerarity, T.L., Pitas, R.E., and Mahley, R.W. (1986). Lipoprotein-receptor interactions. *Methods Enzymol.* **129**, 542–565.
- Ito, J., Nagayasu, Y., Okumura-Noji, K., Lu, R., Nishida, T., Miura, Y., Asai, K., Kheirollah, A., Nakaya, S., and Yokoyama, S. (2007). Mechanism for FGF-1 to regulate biogenesis of apoE-HDL in astrocytes. *J. Lipid Res.* **48**, 2020–2027.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H.J., and Saido, T.C. (2001). Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science* (80-.). **292**, 1550–1552.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993). The Carboxy Terminus of the β Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry* **32**, 4693–4697.
- Jarvik, G.P., Wijsman, E.M., Kukull, W.A., Schellenberg, G.D., Yu, C., and Larson, E.B. (1995). Interactions of apolipoprotein e genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of alzheimer's disease: A case-control study. *Neurology* **45**, 1092–1096.
- Ji, Z.-S., Pitas, R.E., and Mahley, R.W. (1998). Differential Cellular Accumulation/Retention of Apolipoprotein E Mediated by Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **273**, 13452–13460.
- Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T.M., Collins, J.L., et al. (2008). ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of A β .

Neuron 58, 681–693.

Kaiyala, K.J., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., Woods, S.C., and Schwartz, M.W. (2000). Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* 49, 1525–1533.

Kanekiyo, T., Cirrito, J.R., Liu, C.-C., Shinohara, M., Li, J., Schuler, D.R., Shinohara, M., Holtzman, D.M., and Bu, G. (2013). Neuronal Clearance of Amyloid- by Endocytic Receptor LRP1. *J. Neurosci.* 33, 19276–19283.

Kang, D.E., Pietrzik, C.U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D.E., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Troncoso, J.C., Kawas, C.H., Katzman, R., et al. (2000). Modulation of amyloid β -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J. Clin. Invest.* 106, 1159–1166.

Kappeler, L., De Magalhaes Filho, C., Dupont, J., Leneuve, P., Cervera, P., Périn, L., Loudes, C., Blaise, A., Klein, R., Epelbaum, J., et al. (2008). Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol.* 6, 2144–2153.

Karssemeijer, E.G.A., Aaronson, J.A., Bossers, W.J.R., Donders, R., Olde Rikkert, M.G.M., and Kessels, R.P.C. (2019). The quest for synergy between physical exercise and cognitive stimulation via exergaming in people with dementia: a randomized controlled trial. *Alzheimers. Res. Ther.* 11, 1–13.

Kim, J., Castellano, J.M., Jiang, H., Basak, J.M., Parsadanian, M., Pham, V., Mason, S.M., Paul, S.M., and Holtzman, D.M. (2009). Overexpression of Low-Density Lipoprotein Receptor in the Brain Markedly Inhibits Amyloid Deposition and Increases Extracellular A β Clearance. *Neuron* 64, 632–644.

Kiran, G., Prasada Rao, U.J.S., Salimath, P. V., and Chilkunda, N.D. (2017). Diet-induced hypercholesterolemia alters liver glycosaminoglycans and associated-lipoprotein receptors in rats. *J. Physiol. Biochem.* 73, 539–550.

Kjellen, L., Bielefeld, D., and Hook, M. (1983). Reduced sulfation of liver heparan sulfate in experimentally diabetic rats. *Diabetes* 32, 337–342.

Von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., Van Der Ploeg, L.H.T., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18, 661–669.

Kockx, M., Traini, M., and Kritharides, L. (2018). Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. *J. Mol. Med.* 96, 361–371.

- Korte, M., Herrmann, U., Zhang, X., and Draguhn, A. (2012). The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: Lessons from genetic mouse models. *Exp. Brain Res.* 217, 435–440.
- Kothari, V., Luo, Y., Tornabene, T., O'Neill, A.M., Greene, M.W., Geetha, T., and Babu, J.R. (2017). High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 499–508.
- Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted β -amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82, 331–340.
- Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., Arthur, F., and Exercise, S.J.C. (2006). Neural Changes Associated with Training Exercise , cognition , and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101, 1237–1242.
- Krimbou, L., Denis, M., Haidar, B., Carrier, M., Marcil, M., and Genest, J. (2004). Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *J. Lipid Res.* 45, 839–848.
- Kuhn, P.H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Roßner, S., and Lichtenthaler, S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29, 3020–3032.
- Kurochkin, I. V., and Goto, S. (1994). Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 345, 33–37.
- Lackey, B.R., Gray, S.L., and Henricks, D.M. (2000). Actions and interactions of the IGF system in Alzheimer's disease: Review and hypotheses. *Growth Horm. IGF Res.* 10, 1–13.
- LaDu, M.J., Pederson, T.M., Frail, D.E., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Falduto, M.T. (1995). Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 270, 9039–9042.
- LaDu, M.J., Gilligan, S.M., Lukens, J.R., Cabana, V.G., Reardon, C.A., Van Eldik, L.J., and Holtzman, D.M. (2002). Nascent Astrocyte Particles Differ from Lipoproteins in CSF. *J. Neurochem.* 70, 2070–2081.
- Laitinen, M.H., Ngandu, T., Rovio, S., Helkala, E.L., Uusitalo, U., Viitanen, M., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Kivipelto, M. (2006). Fat intake at midlife and risk of dementia and Alzheimer's disease: A population-based study. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 22, 99–107.
- Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Slegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O.,

- Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **41**, 1094–1099.
- Lautner, R., Palmqvist, S., Mattsson, N., Andreasson, U., Wallin, A., Pålsson, E., Jakobsson, J., Herukka, S.K., Owenius, R., Olsson, B., et al. (2014). Apolipoprotein e genotype and the diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid biomarkers for alzheimer disease. *JAMA Psychiatry* **71**, 1183–1191.
- Laviola, L., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2007). The IGF-I Signaling Pathway. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 663–669.
- Lawrence, M.C., McKern, N.M., and Ward, C.W. (2007). Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 699–705.
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M.Y., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K., and Sisodia, S.S. (2005). Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* **120**, 701–713.
- Lee, C.C., Huang, C.C., and Hsu, K. Sen (2011). Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology* **61**, 867–879.
- Lee, H.-K., Kumar, P., Fu, Q., Rosen, K.M., and Querfurth, H.W. (2009). The Insulin/Akt Signaling Pathway Is Targeted by Intracellular β -Amyloid. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1533–1544.
- Leissring, M.A. (2008). The A β Cs of A β -cleaving proteases. *J. Biol. Chem.* **283**, 29645–29649.
- Lestaevel, P., Airault, F., Racine, R., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Manens, L., Aigueperse, J., Voisin, P., and Souidi, M. (2014). Influence of environmental enrichment and depleted uranium on behaviour, cholesterol and acetylcholine in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* **53**, 469–479.
- Levi, O., and Michaelson, D.M. (2007). Environmental enrichment stimulates neurogenesis in apolipoprotein E3 and neuronal apoptosis in apolipoprotein E4 transgenic mice. *J. Neurochem.* **100**, 202–210.
- Liu, C.-C., Hu, J., Zhao, N., Wang, J., Wang, N., Cirrito, J.R., Kanekiyo, T., Holtzman, D.M., and Bu, G. (2017). Astrocytic LRP1 Mediates Brain A β Clearance and Impacts Amyloid Deposition. *J. Neurosci.* **37**, 4023–4031.
- Liu, M., Kuhel, D.G., Shen, L., Hui, D.Y., and Woods, S.C. (2012). Apolipoprotein E does not cross the blood-cerebrospinal fluid barrier, as revealed by an improved technique for sampling

- CSF from mice. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **303**, 903–908.
- Llorens-Martín, M., Tejeda, G.S., and Trejo, J.L. (2010). Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: A dual birthdating analysis. *PLoS One* **5**, e12188. 6-15.
- Logan, S., Pharaoh, G.A., Marlin, M.C., Masser, D.R., Matsuzaki, S., Wronowski, B., Yeganeh, A., Parks, E.E., Premkumar, P., Farley, J.A., et al. (2018). Insulin-like growth factor receptor signaling regulates working memory, mitochondrial metabolism, and amyloid- β uptake in astrocytes. *Mol. Metab.* **9**, 141–155.
- Lomakin, A., Teplow, D.B., Kirschner, D.A., and Benedek, G.B. (1997). Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7942–7947.
- Love, S. (2004). Contribution of cerebral amyloid angiopathy to Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 1–4.
- Lowe, W.L., Roberts, C.T., Lasky, S.R., and LeRoith, D. (1987). Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 8946–8950.
- Lu, R., Ito, J., Iwamoto, N., Nishimaki-Mogami, T., and Yokoyama, S. (2009). FGF-1 induces expression of LXR α and production of 25-hydroxycholesterol to upregulate the apoE gene in rat astrocytes. *J. Lipid Res.* **50**, 1156–1164.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Stern, Y., Shea, S., and Mayeux, R. (2001). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am. J. Epidemiol.* **154**, 635–641.
- Mahley, R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **240**, 622–630.
- Mahley, R.W., and Ji, Z.S. (1999). Remnant lipoprotein metabolism: Key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res.*
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.* **50**, S183–S188.
- Manassero, G., Guglielmotto, M., Zamfir, R., Borghi, R., Colombo, L., Salmons, M., Perry, G., Odetti, P., Arancio, O., Tamagno, E., et al. (2016). Beta-amyloid 1-42 monomers, but not oligomers, produce PHF-like conformation of Tau protein. *Aging Cell* **15**, 914–923.
- Markowska, A.L., Mooney, M., and Sonntag, W.E. (1998). Insulin-like growth factor-1

- ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* 87, 559–569.
- Matsuo, M., Campenot, R.B., Vance, D.E., Ueda, K., and Vance, J.E. (2011). Involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein and ABCG1 in stimulation of axonal extension by apoE-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 31–38.
- Matsushima, T., Saito, Y., Elliott, J.I., Iijima-Ando, K., Nishimura, M., Kimura, N., Hata, S., Yamamoto, T., Nakaya, T., and Suzuki, T. (2012). Membrane-microdomain localization of amyloid β -precursor protein (APP) C-terminal fragments is regulated by phosphorylation of the cytoplasmic Thr668 residue. *J. Biol. Chem.* 287, 19715–19724.
- Mauch, D.H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E.C., Otto, A., and Pfrieder, F.W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* (80-.). 294, 1354–1357.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010). Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science* (80-.). 330, 1774.
- May, P., Krishna Reddy, Y., and Herz, J. (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.* 277, 18736–18743.
- McGowan, E., Eriksen, J., and Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.* 22, 281–289.
- McNay, E.C., Ong, C.T., McCrimmon, R.J., Cresswell, J., Bogan, J.S., and Sherwin, R.S. (2010). Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 546–553.
- Mecha, M. (2011). An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Protoc. Exch.*
- Meyer, M.R., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Welsh-Bohmer, K.A., Steffens, D.C., Wyse, B.W., and Breitner, J.C.S. (1998). APOE genotype predicts when-not whether-one is predisposed to develop Alzheimer disease [2]. *Nat. Genet.* 19, 321–322.
- Michikawa, M., Fan, Q.W., Isobe, I., and Yanagisawa, K. (2000). Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 74, 1008–1016.
- Minami, S.S., Cordova, A., Cirrito, J.R., Tesoriero, J.A., Babus, L.W., Davis, G.C.,

- Dakshanamurthy, S., Turner, R.S., Pak, D.T., Rebeck, G.W., et al. (2010). ApoE mimetic peptide decreases A β production in vitro and in vivo. *Mol. Neurodegener.* 5, 1–12.
- Moloney, A.M., Griffin, R.J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., and O'Neill, C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol. Aging* 31, 224–243.
- Muche, A., Arendt, T., Schliebs, R., Piccini, A., Borghi, R., and Guglielmotto, M. (2017). Oxidative stress affects processing of amyloid precursor protein in vascular endothelial cells. *PLoS One* 12, e0178127. 1-15.
- Mudra, D.R., and Parkinson, A. (2004). Preparation of Hepatocytes. *Curr. Protoc. Toxicol.* 1–13.
- Mulder, S.D., Nielsen, H.M., Blankenstein, M.A., Eikelenboom, P., and Veerhuis, R. (2014). Apolipoproteins E and J interfere with amyloid-beta uptake by primary human astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 62, 493–503.
- Muller, A.P., Fernandez, A.M., Haas, C., Zimmer, E., Portela, L.V., and Torres-Aleman, I. (2012). Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 9–12.
- Mustafa, A., Lannfelt, L., Lilius, L., Islam, A., Winblad, B., and Adem, A. (1999). Decreased plasma insulin-like growth factor-I level in familial Alzheimer's disease patients carrying the Swedish APP 670/671 mutation. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 10, 446–451.
- Naidu, A., Xu, Q., Catalano, R., and Cordell, B. (2002). Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain Res.* 958, 100–111.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541, 163–166.
- Narita, M., Holtzman, D.M., Fagan, A.M., Jo, M., Yu, L., Gross, R.W., Biv, G., and Schwartz, A.L. (2002). Cellular Catabolism of Lipid Poor Apolipoprotein E via Cell Surface LDL receptor-related protein. *J. Biochemistry* 132, 743–749.
- Nathan, B.P., Jiang, Y.W., Wong, G.K., Shen, F., Brewer, G.J., and Struble, R.G. (2002). Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain Res.* 928, 96–105.
- Navab, R., Pedraza, C., Fallavollita, L., Wang, N., Chevet, E., Auguste, P., Jenna, S., You, Z., Bikfalvi, A., Hu, J., et al. (2008). Loss of responsiveness to IGF-I in cells with reduced cathepsin L

expression levels. *Oncogene* 27, 4973–4985.

Nazer, B., Hong, S., and Selkoe, D.J. (2008). LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid- β peptide in a blood–brain barrier in vitro model. *Neurobiol. Dis.* 30, 94–102.

Nielsen, H.M., Mulder, S.D., Beliën, J.A.M., Musters, R.J.P., Eikelenboom, P., and Veerhuis, R. (2010). Astrocytic A β 1-42 uptake is determined by A β -aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia* 58, 1235–1246.

Nishijima, T., Piriz, J., Duflot, S., Fernandez, A.M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., Verdugo, J.M.G., Leroy, F., Soya, H., Nuñez, A., et al. (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron* 67, 834–846.

Nishitsuji, K., Hosono, T., Nakamura, T., Bu, G., and Michikawa, M. (2011). Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J. Biol. Chem.* 286, 17536–17542.

Notkola, I.L., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkinjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P., Tuomilehto, J., and Nissinen, A. (1998). Serum total cholesterol, apolipoprotein E ϵ 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17, 14–20.

Novak, V., Milberg, W., Hao, Y., Munshi, M., Novak, P., Galica, A., Manor, B., Roberson, P., Craft, S., and Abduljalil, A. (2014). Enhancement of vasoreactivity and cognition by intranasal insulin in Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 37, 751–759.

Nuriel, T., Peng, K.Y., Ashok, A., Dillman, A.A., Figueroa, H.Y., Apuzzo, J., Ambat, J., Levy, E., Cookson, M.R., Mathews, P.M., et al. (2017). The endosomal-lysosomal pathway is dysregulated by APOE4 expression in vivo. *Front. Neurosci.* 11, 1–12.

O'Kusky, J.R., Ye, P., and D'Ercole, A.J. (2000). Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* 20, 8435–8442.

Okubo, Y., Blakesley, V.A., Stannard, B., Gutkind, S., and Roith, D. Le (1998). Insulin-like growth factor-I inhibits the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. 273, 25961–25966.

Olson, A.K., Eadie, B.D., Ernst, C., and Christie, B.R. (2006). Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus* 16, 250–260.

Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén,

- C., Olsson, C., Strobel, G., et al. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 15, 673–684.
- Ong, Q.R., Chan, E.S., Lim, M.L., Cole, G.M., and Wong, B.S. (2014). Reduced phosphorylation of brain insulin receptor substrate and Akt proteins in apolipoprotein-E4 targeted replacement mice. *Sci. Rep.* 4, 1–8.
- Ostrowski, P.P., Barszczyk, A., Forstenpointner, J., Zheng, W., and Feng, Z.P. (2016). Meta-analysis of serum insulin-like growth factor 1 in Alzheimer's disease. *PLoS One* 11.
- Pankiewicz, J.E., Guridi, M., Kim, J., Asuni, A.A., Sanchez, S., Sullivan, P.M., Holtzman, D.M., and Sadowski, M.J. (2014). Blocking the apoE/A β interaction ameliorates A β -related pathology in APOE ϵ 2 and ϵ 4 targeted replacement Alzheimer model mice. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 1–11.
- Paolisso, G., Ammendola, S., Del Buono, A., Gambardella, A., Riondino, M., Tagliamonte, M.R., Rizzo, M.R., Carella, C., and Varricchio, M. (1997). Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: Relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2204–2209.
- Park, C.R., Seeley, R.J., Craft, S., and Woods, S.C. (2000). Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol. Behav.* 68, 509–514.
- Pathan, A.R., Gaikwad, A.B., Viswanad, B., and Ramarao, P. (2008). Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 176–179.
- Peng, K.Y., Pérez-González, R., Alldred, M.J., Goulbourne, C.N., Morales-Corraliza, J., Saito, M., Saito, M., Ginsberg, S.D., Mathews, P.M., and Levy, E. (2019). Apolipoprotein E4 genotype compromises brain exosome production. *Brain* 142, 163–175.
- Perrière, N., Yousif, S., Cazaubon, S., Chaverot, N., Bourasset, F., Cisternino, S., Declèves, X., Hori, S., Terasaki, T., Deli, M., et al. (2007). A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res.* 1150, 1–13.
- Perugini, M.A., Schuck, P., and Howlett, G.J. (2000). Self-association of human apolipoprotein E3 and E4 in the presence and absence of phospholipid. *J. Biol. Chem.* 275, 36758–36765.
- Peters-Libeu, C.A., Newhouse, Y., Hatters, D.M., and Weisgraber, K.H. (2006). Model of biologically active apolipoprotein E bound to dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 281, 1073–1079.

- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F.X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., et al. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1687–1699.
- Pflanzner, T., Janko, M.C., André-Dohmen, B., Reuss, S., Weggen, S., Roebroek, A.J.M., Kuhlmann, C.R.W., and Pietrzik, C.U. (2011). LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- β across the blood-brain barrier. *Neurobiol. Aging* 32, 1–11.
- Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M.Y., and Klein, P.S. (2003). GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Nature* 423, 435–439.
- Pietrzik, C.U. (2004). FE65 Constitutes the Functional Link between the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* 24, 4259–4265.
- Pimenova, A.A., Raj, T., and Goate, A.M. (2018). Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* 83, 300–310.
- Pimplikar, S.W., Nixon, R.A., Robakis, N.K., Shen, J., and Tsai, L.-H. (2010). Amyloid-Independent Mechanisms in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J. Neurosci.* 30, 14946–14954.
- Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D., and Mahley, R.W. (1987). Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 917, 148–161.
- Podewils, L.J., Guallar, E., Kuller, L.H., Fried, L.P., Lopez, O.L., Carlson, M., and Lyketsos, C.G. (2005). Physical activity, APOE genotype, and dementia risk: Findings from the Cardiovascular Health Cognition Study. *Am. J. Epidemiol.* 161, 639–651.
- Pohlkamp, T., Wasser, C.R., and Herz, J. (2017). Functional Roles of the Interaction of APP and Lipoprotein Receptors. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–22.
- Poirier, J., Baccichet, A., Dea, D., and Gauthier, S. (1993). Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55, 81–90.
- Posse De Chaves, E.I., Vance, D.E., Campenot, R.B., Kiss, R.S., and Vance, J.E. (2000). Uptake of lipoproteins for axonal growth of sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* 275, 19883–19890.
- Pozo-Rodríguez, A., Gradillas, A., Serrano, J., Fernández, A.P., Martínez-Murillo, R., and Pérez-Castells, J. (2012). New synthesis and promising neuroprotective role in experimental ischemic stroke of ONO-1714. *Eur. J. Med. Chem.* 54, 439–446.

- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 191–198.
- Prasad, H., and Rao, R. (2018). Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E6640–E6649.
- Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer’s disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* *21*, 479–505.
- Prince, J.A., Zetterberg, H., Andreasen, N., Marcusson, J., and Blennow, K. (2004). APOE epsilon4 allele is associated with reduced cerebrospinal fluid levels of Abeta42. *Neurology* *62*, 2116–2118.
- Puglielli, L., Tanzi, R.E., and Kovacs, D.M. (2003). Alzheimer’s disease: The cholesterol connection. *Nat. Neurosci.* *6*, 345–351.
- Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., and Goto, S. (2006). The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* *49*, 387–392.
- Ramaswamy, G. (2005). Effect of Domain Interaction on Apolipoprotein E Levels in Mouse Brain. *J. Neurosci.* *25*, 10658–10663.
- Rapp, A., Gmeiner, B., and Hüttinger, M. (2006). Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* *88*, 473–483.
- Rasmussen, K.L., Tybjærg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G., and Frikke-Schmidt, R. (2015). Plasma levels of apolipoprotein E and risk of dementia in the general population. *Ann. Neurol.* *77*, 301–311.
- Rebeck, G.W., Reiter, J.S., Strickland, D.K., and Hyman, B.T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer’s disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron* *11*, 575–580.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S.D., Thomas-Bryant, T., Tint, G.S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S.S., et al. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces β -amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Dis.* *8*, 890–899.
- Reger, M.A., Watson, G.S., Green, P.S., Baker, L.D., Cholerton, B., Fishel, M.A., Plymate, S.R., Cherrier, M.M., Schellenberg, G.D., Frey, W.H., et al. (2008). Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid- β in memory-impaired older adults. *J. Alzheimer’s Dis.* *13*, 323–331.

- Riddell, D.R., Zhou, H., Atchison, K., Warwick, H.K., Atkinson, P.J., Jefferson, J., Xu, L., Aschmies, S., Kirksey, Y., Hu, Y., et al. (2008). Impact of apolipoprotein E (ApoE) polymorphism on brain ApoE levels. *J. Neurosci.* 28, 11445–11453.
- Ries, M., and Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. *Front. Aging Neurosci.* 8, 1–9.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253, 2769–2776.
- Rivera, E.J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J.R., and De La Monte, S.M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimer's Dis.* 8, 247–268.
- Rohn, T.T. (2014). Is apolipoprotein E4 an important risk factor for vascular dementia? *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 3504–3511.
- Roses, A.D. (1996). Apolipoprotein E Alleles As Risk Factors in Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Med.* 47, 387–400.
- Ruiz, J., Kouliavskaya, D., Migliorini, M., Robinson, S., Saenko, E.L., Gorlatova, N., Li, D., Lawrence, D., Hyman, B.T., Weisgraber, K.H., et al. (2005). The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J. Lipid Res.* 46, 1721–1731.
- Russo, C., Angelini, G., Dapino, D., Piccini, A., Piombo, G., Schettini, G., Chen, S., Teller, J.K., Zaccheo, D., Gambetti, P., et al. (2002). Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15598–15602.
- Ryan, C.M., Freed, M.I., Rood, J.A., Cobitz, A.R., Waterhouse, B.R., and Strachan, M.W.J. (2006). Improving metabolic control leads to better working memory in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29, 345–351.
- Saito, H., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Weisgraber, K.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2001). Lipid Binding-induced Conformational Change in Human Apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 276, 40949–40954.
- Sajan, M.P., Hansen, B.C., Higgs, M.G., Kahn, C.R., Braun, U., Leitges, M., Park, C.R., Diamond, D.M., and Farese, R. V. (2018). Atypical PKC, PKC λ /I, activates β -secretase and increases A β 1–40/42 and phospho-tau in mouse brain and isolated neuronal cells, and may link hyperinsulinemia and other aPKC activators to development of pathological and memory abnormalities in Alzheimer's. *Neurobiol. Aging* 61, 225–237.

- Salameh, T.S., Rhea, E.M., Banks, W.A., and Hanson, A.J. (2016). Insulin resistance, dyslipidemia, and apolipoprotein E interactions as mechanisms in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp. Biol. Med.* 241, 1676–1683.
- Salmon, W.D., and Daughaday, W.H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 49, 825–836.
- Santi, A., Genis, L., and Torres Aleman, I. (2018). A coordinated action of blood-borne and brain insulin-like growth factor I in the response to traumatic brain injury. *Cereb. Cortex* 28, 2007–2014.
- Schellenberg, G.D. (1995). Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8552–8559.
- Segall, M.L., Dhanasekaran, P., Baldwin, F., Anantharamaiah, G.M., Weisgraber, K.H., Phillips, M.C., and Lund-Katz, S. (2002). Influence of apoE domain structure and polymorphism on the kinetics of phospholipid vesicle solubilization. *J. Lipid Res.* 43, 1688–1700.
- Sehat, B., Tofigh, A., Lin, Y., Trocmé, E., Liljedahl, U., Lagergren, J., and Larsson, O. (2010). SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci. Signal.* 3, 1–11.
- Selkoe, D.J. (2001). Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs. *Neuron* 32, 177–180.
- Sharma, S., Prasanthi R.P., J., Schommer, E., Feist, G., and Ghribi, O. (2008). Hypercholesterolemia-induced A β accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling. *Neurobiol. Dis.* 32, 426–432.
- Shiiki, T. (2004). Brain Insulin Impairs Amyloid- (1-40) Clearance from the Brain. *J. Neurosci.* 24, 9632–9637.
- Shobab, L.A., Hsiung, G.Y.R., and Feldman, H.H. (2005). Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 4, 841–852.
- Shore, V.G., and Shore, B. (1973). Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12, 502–507.
- Siddle, K. (2011). Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 47, R1–R10.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C.G., and Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6460–6464.

- Sisodia, S., Koo, E., Hoffman, P., Perry, G., and Price, D. (2018). Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J. Neurosci.* *13*, 3136–3142.
- Slooter, A.J.C., Tang, M.X., Van Duijn, C.M., Stern, Y., Ott, A., Bell, K., Breteler, M.M.B., Van Broeckhoven, C., Tatemichi, T.K., Tycko, B., et al. (1997). Apolipoprotein E ϵ 4 and the risk of dementia with stroke: A population- based investigation. *J. Am. Med. Assoc.* *277*, 818–821.
- Solano, D.C., Sironi, M., Bonfini, C., and Solerte, S.B. (2000). Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent. *FASEB J.* *14*, 1015–1022.
- Starck, M., Bertrand, P., Pépin, S., Schiele, F., Siest, G., and Galteau, M.M. (2000). Effects of pro-inflammatory cytokines on apolipoprotein E secretion by a human astrocytoma cell line (CCF-STTG1). *Cell Biochem. Funct.* *18*, 9–16.
- Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., and De La Monte, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer’s disease - Is this type 3 diabetes? *J. Alzheimer’s Dis.* *7*, 63–80.
- Stelzmann, R.A., Norman Schnitzlein, H., and Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer’s 1907 paper, “über eine eigenartige erkankung der hirnrinde.” *Clin. Anat.* *8*, 429–431.
- Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8098–8102.
- Suzuki, R., Lee, K., Jing, E., Biddinger, S.B., McDonald, J.G., Montine, T.J., Craft, S., and Kahn, C.R. (2010). Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab.* *12*, 567–579.
- Talbot, K., Wang, H.-Y., Kazi, H., Han, L.-Y., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., et al. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* *122*, 1316–1338.
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Monteleone, D., Manassero, G., Vasciaveo, V., and Tabaton, M. (2018). The Unexpected Role of A β 1-42 Monomers in the Pathogenesis of Alzheimer’s

Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 62, 1241–1245.

Tamaki, C., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2007). Insulin Facilitates the Hepatic Clearance of Plasma Amyloid beta-Peptide (1 40) by Intracellular Translocation of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1) to the Plasma Membrane in Hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 72, 850–855.

Tamboli, I.Y., Heo, D., and Rebeck, G.W. (2014). Extracellular proteolysis of apolipoprotein e (apoE) by secreted serine neuronal protease. *PLoS One* 9, 1–12.

Tanokashira, D., Kurata, E., Fukuokaya, W., Kawabe, K., Kashiwada, M., Takeuchi, H., Nakazato, M., and Taguchi, A. (2018). Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory via phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *FEBS Open Bio* 8, 1104–1118.

Taylor, C.J., Ireland, D.R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N.M., Turner, P.R., Bilkey, D.K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol. Dis.* 31, 250–260.

Tham, A., Nordberg, A., Grissom, F.E., Carlsson-Skwirut, C., Viitanen, M., and Sara, V.R. (1993). Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Neural Transm. - Park. Dis. Dement. Sect.* 5, 165–176.

Theendakara, V., Peters-Libeu, C.A., Spilman, P., Poksay, K.S., Bredesen, D.E., and Rao, R. V. (2016). Direct Transcriptional Effects of Apolipoprotein E. *J. Neurosci.* 36, 685–700.

Tokuda, T., Calero, M., Matsubara, E., Vidal, R., Kumar, A., Permanne, B., Zlokovic, B., Smith, J.D., Ladu, M.J., Rostagno, A., et al. (2000). Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem. J.* 348, 359–365.

Toledo, J.B., Da, X., Weiner, M.W., Wolk, D.A., Xie, S.X., Arnold, S.E., Davatzikos, C., Shaw, L.M., and Trojanowski, J.Q. (2014). CSF Apo-E levels associate with cognitive decline and MRI changes. *Acta Neuropathol.* 127, 621–632.

Torres-aleman, I. (2003). Brain Repair and Neuroprotection by Serum Insulin-Like Growth Factor I Eva Carro , 1 Jose Luis Trejo , 1 Angel Núñez , 2. *Mol. Neurobiol.* 27, 153–162.

Tracy, T.E., and Gan, L. (2018). Tau-mediated synaptic and neuronal dysfunction in neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 51, 134–138.

- Trejo, J.L., Llorens-Martín, M. V., and Torres-Alemán, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 402–411.
- Trommsdorff, M., Borg, J.P., Margolis, B., and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 273, 33556–33560.
- Trueba-Saiz, A., Fernandez, A.M., Nishijima, T., Mecha, M., Santi, A., Munive, V., and Torres Aleman, I. (2017). Circulating insulin-like growth factor i regulates its receptor in the brain of male mice. *Endocrinology* 158, 349–355.
- Trueba-Sáiz, A., Cavada, C., Fernandez, A.M., Leon, T., González, D.A., Fortea Ormaechea, J., Lleó, A., Del Ser, T., Nuñez, A., and Torres-Aleman, I. (2013). Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl. Psychiatry* 3, 1–6.
- Tumati, S., Burger, H., Martens, S., Van Der Schouw, Y.T., and Aleman, A. (2016). Association between cognition and serum insulin-like growth factor-1 in middle-aged & older men: An 8 year follow-up study. *PLoS One* 11.
- Ulery, P.G., Beers, J., Mikhailenko, I., Tanzi, R.E., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (2000). Modulation of β -amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 275, 7410–7415.
- Ulrich, J.D., Burchett, J.M., Restivo, J.L., Schuler, D.R., Verghese, P.B., Mahan, T.E., Landreth, G.E., Castellano, J.M., Jiang, H., Cirrito, J.R., et al. (2013). In vivo measurement of apolipoprotein e from the brain interstitial fluid using microdialysis. *Mol. Neurodegener.* 8, 1–7.
- Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U., and Weber, W. (1980). Genetics of the apolipoprotein E system in man. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 339–347.
- Vanhanen, M., Koivisto, K., Kuusisto, J., Mykkänen, L., Helkala, E.L., Hänninen, T., Riekkinen, P., Soininen, H., and Laakso, M. (1998). Cognitive function in an elderly population with persistent impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 21, 398–402.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* (80-.). 286, 735–741.

- Verghese, P.B., Castellano, J.M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., Bu, G., Frieden, C., and Holtzman, D.M. (2013). ApoE influences amyloid- (A) clearance despite minimal apoE/A association in physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E1807–E1816.
- Vidal, J.S., Hanon, O., Funalot, B., Brunel, N., Viollet, C., Rigaud, A.S., Seux, M.L., Le-Bouc, Y., Epelbaum, J., and Duron, E. (2016). Low Serum Insulin-Like Growth Factor-I Predicts Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* *52*, 641–649.
- Vieira, M., Gomes, J.R., and Saraiva, M.J. (2015). Transthyretin Induces Insulin-like Growth Factor I Nuclear Translocation Regulating Its Levels in the Hippocampus. *Mol. Neurobiol.* *51*, 1468–1479.
- Walter, H.J., Berry, M., Hill, D.J., and Logan, A. (1997). Spatial and Temporal Changes in the Insulin-Like Growth Factor (IGF) Axis Indicate Autocrine/Paracrine Actions of IGF-I within Wounds of the Rat Brain*. *Endocrinology* *138*, 3024–3034.
- Watanabe, T., Miyazaki, A., Katagiri, T., Yamamoto, H., Idei, T., and Iguchi, T. (2005). Relationship between serum insulin-like growth factor-1 levels and Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* *53*, 1748–1753.
- Weeber, E.J., Beffert, U., Jones, C., Christian, J.M., Forster, E., Sweatt, J.D., and Herz, J. (2002). Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J. Biol. Chem.* *277*, 39944–39952.
- Wei, W., Wang, X., and Kusiak, J.W. (2002). Signaling events in amyloid β -peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J. Biol. Chem.* *277*, 17649–17656.
- Weisgraber, K.H. (1990). Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.* *31*, 1503–1511.
- Weisgraber, K.H. (1994). Apolipoprotein E: Structure-Function Relationships. *Adv. Protein Chem.* *45*, 249–302.
- Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. (2018). Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J.* *10*, 1485–1494.
- Weisgraber, K.H., Rall, S.C., and Mahley, R.W. (1981). Human E Apoprotein Heterogeneity. *J. Bioenerg. Biomembr.* *259*, 9077–9083.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *283*, E413–E422.
- Wilson, C., Wardell, M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., Agard, D.A., Wilson, C., Wardell,

- M.R., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., and Agard, D.A. (1991). Three-Dimensional Structure of the LDL Receptor-Binding Domain of Human Apolipoprotein E. *Science* (80-.). 252, 1817–1822.
- Wingo, T.S., Lah, J.J., Levey, A.I., and Cutler, D.J. (2012). Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 69, 59–64.
- Wisniewski, T., and Frangione, B. (1992). Apolipoprotein E: A pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.* 135, 235–238.
- Wollmer, M.A., Streffer, J.R., Lütjohann, D., Tsolaki, M., Iakovidou, V., Hegi, T., Pasch, T., Jung, H.H., Von Bergmann, K., Nitsch, R.M., et al. (2003). ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 421–426.
- Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W., and Martins, R. (2002). Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J. Neurosci.* 22, 1–5.
- Xu, P.T., Schmechel, D., Qiu, H.L., Herbstreith, M., Rothrock-Christian, T., Eyster, M., Roses, a D., and Gilbert, J.R. (1999). Sialylated human apolipoprotein E (apoEs) is preferentially associated with neuron-enriched cultures from APOE transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 6, 63–75.
- Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci.* 26, 4985–4994.
- Yamamoto, T., and Ryan, R.O. (2006). Role of leucine zipper motif in apoE3 N-terminal domain lipid binding activity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761, 1100–1106.
- Yamauchi, K., Tozuka, M., Hidaka, H., Hidaka, E., Kondo, Y., and Katsuyama, T. (1999). Characterization of apolipoprotein E-containing lipoproteins in cerebrospinal fluid: Effect of phenotype on the distribution of apolipoprotein E. *Clin. Chem.* 45, 1431–1438.
- Yang, D.-S., Smith, J.D., Zhou, Z., Gandy, S.E., and Martins, R.N. (1997). Characterization of the Binding of Amyloid- β Peptide to Cell Culture-Derived Native Apolipoprotein E2, E3, and E4 Isoforms and to Isoforms from Human Plasma. *J. Neurochem.* 68, 721–725.
- Yang, M., Virassamy, B., Vijayaraj, S.L., Lim, Y., Saadipour, K., Wang, Y.J., Han, Y.C., Zhong, J.H., Morales, C.R., and Zhou, X.F. (2013). The Intracellular Domain of Sortilin Interacts with Amyloid Precursor Protein and Regulates Its Lysosomal and Lipid Raft Trafficking. *PLoS One* 8, e63049. 1-13.

- Yang, W., Wu, Q., Yuan, C., Gao, J., Xiao, M., Gu, M., Ding, J., and Hu, G. (2012). Aquaporin-4 mediates astrocyte response to β -amyloid. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 406–414.
- Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., and Mahley, R.W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 18700–18705.
- Yeh, F.L., Wang, Y., Tom, I., Gonzalez, L.C., and Sheng, M. (2016). TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* 91, 328–340.
- Yoshikai, S. ichi, Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257–263.
- Youmans, K.L., Tai, L.M., Nwabuisi-Heath, E., Jungbauer, L., Kanekiyo, T., Gan, M., Kim, J., Eimer, W.A., Estus, S., Rebeck, G.W., et al. (2012). APOE4-specific changes in A β accumulation in a new transgenic mouse model of alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 287, 41774–41786.
- Zaiou, M., Arnold, K.S., Newhouse, Y.M., Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Segall, M.L., Phillips, M.C., and Lund-Katz, S. (2000). Apolipoprotein E; low density lipoprotein receptor interaction. Influences of basic residue and amphipathic alpha-helix organization in the ligand. *J Lipid Res* 41, 1087–1095.
- Zannis, V.I., and Breslow, J.L. (1980). Characterization of a unique human apolipoprotein E variant associated with type III hyperlipoproteinemia. *J. Biol. Chem.* 255, 1759–1762.
- Zhang, B., Tang, X.C., and Zhang, H.Y. (2013). Alternations of central insulin-like growth factor-1 sensitivity in APP/PS1 transgenic mice and neuronal models. *J. Neurosci. Res.* 91, 717–725.
- Zhang, H., Gao, Y., Dai, Z., Meng, T., Tu, S., and Yan, Y. (2011). IGF-1 reduces BACE-1 expression in PC12 cells via activation of PI3-K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways. *Neurochem. Res.* 36, 49–57.
- Zhao, J., O'Connor, T., and Vassar, R. (2011). The contribution of activated astrocytes to A β production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation* 8, 6–16.
- Zhao, N., Liu, C.-C., Van Ingelgom, A.J., Martens, Y.A., Linares, C., Knight, J.A., Painter, M.M., Sullivan, P.M., and Bu, G. (2017). Apolipoprotein E4 Impairs Neuronal Insulin Signaling by Trapping Insulin Receptor in the Endosomes. *Neuron* 96, 115–129.
- Zheng, H., and Koo, E.H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein.

Mol. Neurodegener. 6, 1–16.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J.S., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S., Conner, M.W., et al. (1995). B-Amyloid Precursor Protein-Deficient Mice Show Reactive Gliosis and Decreased Locomotor Activity. *Cell* 81, 525–531.

Zhong, N., Searce-Levie, K., Ramaswamy, G., and Weisgraber, K.H. (2008). Apolipoprotein E4 domain interaction: Synaptic and cognitive deficits in mice. *Alzheimer's Dement.* 4, 179–192.

Zimbone, S., Monaco, I., Gianì, F., Pandini, G., Copani, A.G., Giuffrida, M.L., and Rizzarelli, E. (2018). Amyloid Beta monomers regulate cyclic adenosine monophosphate response element binding protein functions by activating type-1 insulin-like growth factor receptors in neuronal cells. *Aging Cell* 17.

Zlokovic, B. V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., and Winkler, E.A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the brain. *J. Neurochem.* 115, 1077–1089.

Anexos



ANEXO I

Las isoformas de apoE recombinante apoE2 y apoE4 sin lipidar ejercen un efecto inhibitorio sobre la internalización de IGF-I por las células endoteliales en cultivo, cuya acción de apoE4 es mayor a la de apoE2, de manera similar al efecto observado para las isoformas recombinantes asociadas a DMPC.

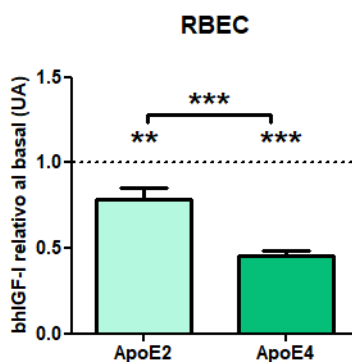


Figura 37. ApoE disminuye la internalización de IGF-I por células de endotelio dependiente de isoforma.

Cuantificación de densidad óptica correspondiente al bhIGF-I internalizado por las células endoteliales tras el tratamiento con las isoformas apoE2 y apoE4 sin lipidar. Resultados expresados en unidades arbitrarias (UA). Media \pm error típico, n=3, por triplicado. ANOVA de una vía; post-hoc

ANEXO II

La isquemia hemorrágica producida como consecuencia de la sección de la arteria cerebral media de hemisferio derecho produce una lesión que afecta a la corteza frontal y alcanza hasta regiones somatosensoriales, de dicho hemisferio.



Figura 38. Fotografía de rodajas de cerebro de ratón tras isquemia hemorrágica teñido con TTC.

Se muestra la imagen de rodajas de 1mm de cerebro de ratón, 7 días post isquemia teñido con TTC, en rojo el tejido sano, frente a la zona lesionada por la isquemia, en blanco.

Apéndice



DOCUMENTO DE ACTIVIDADES DEL DOCTORANDO

D/Dña Raquel Herrero Labrador

Programa de Doctorado de Neurociencia



Nombre	Departamento	Entidad
Torres Aleman, Ignacio		Universidad Autónoma de Madrid

Actividad: Formación científica continuada de ámbito pluridisciplinar

Descripción:	Neuropharmacology 2015
Curso académico	2014/15
Fechas:	12/02/2015 - 12/02/2015
Universidad o Entidad:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Redacción de documentos científicos (Neurociencia)

Descripción:	Antioxid Redox Signal. 2015
Curso académico	2014/15
Fechas:	12/02/2015 - 12/02/2015
Universidad o Entidad:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Formación y actualización en técnicas y métodos de laboratorio y procedimientos básicos de gestión de la investigación

Descripción:	Curso Categoría C de experimentación animal: Persona que diseña y dirige los procedimientos con animales
Curso académico	2015/16
Fechas:	07/09/2015 - 09/10/2015
Universidad o Entidad:	Animalaria Formación y gestión S.L.
País:	España
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Asistencia y participación en reuniones científicas externas, jornadas, simposios o congresos

Descripción:	Asistencia a seminarios periódicos impartidos en el centro de investigación en el que se está realizando la tesis doctoral
Curso académico	2015/16
Fechas:	20/01/2015 - 19/01/2016
Universidad o Entidad:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Otras actividades

Descripción:	Supervisión de trabajo Fin de grado
Curso académico	2015/16
Fechas:	25/01/2016 - 31/05/2016
Universidad o Entidad:	Universidad de Alcalá de Henares
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada
Observaciones:	Supervisión del Trabajo de Fin de grado titulado: "Papel de apoE en la entrada de IGF-1 a través de la barrera hematoencefálica". Por la alumna Jeniffer Sanguino Gómez en la universidad de Alcalá de Henares.

Actividad: Asistencia y participación en reuniones científicas externas, jornadas, simposios o congresos

Descripción:	Reuniones periódicas con el grupo de investigación para la presentación de los resultados obtenidos.
Curso académico	2015/16
Fechas:	01/04/2015 - 19/01/2016
Universidad o Entidad:	Instituto Cajal, CSIC
País:	España
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Formación y actualización en técnicas y métodos de laboratorio y procedimientos básicos de gestión de la investigación

Descripción:	Curso fundamentos de estadística aplicada a la investigación. Muestreo, diseño experimental e inferencia
Curso académico	2016/17
Fechas:	03/05/2016 - 06/05/2016
Universidad o Entidad:	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
País:	España
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Formación y actualización en técnicas y métodos de laboratorio y procedimientos básicos de gestión de la investigación

Descripción:	curso cálculo tamaños muestrales
Curso académico	2016/17
Fechas:	27/06/2016 - 30/06/2016
Universidad o Entidad:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Redacción de documentos científicos (Neurociencia)

Descripción:	J Psychiatry Neurosci. 2017
Curso académico	2017/18
Fechas:	28/03/2016 - 28/03/2016
Universidad o Entidad:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada
Observaciones:	Publicación como autor principal en co-autoría junto a M ^a Paz Serrano. Requisito obligatorio del programa de Doctorado

Actividad: Asistencia y participación en reuniones científicas externas, jornadas, simposios o congresos

Descripción:	Seminario Metabolism: From Brain to Periphery,
Curso académico	2017/18
Fechas:	29/06/2017 - 01/07/2017
Universidad o Entidad:	Universidad Rey Juan Carlos
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Asistencia y participación en reuniones científicas externas, jornadas, simposios o congresos

Descripción:	asistencia seminarios
Curso académico	2018/19
Fechas:	09/01/2018 - 20/12/2018
Universidad o Entidad:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Asistencia y participación en reuniones científicas externas, jornadas, simposios o congresos

Descripción:	Asistencia a I CBMSO Molecular Neurophatology Day
Curso académico	2018/19
Fechas:	16/02/2018 - 16/02/2018
Universidad o Entidad:	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Asistencia y participación en reuniones científicas externas, jornadas, simposios o congresos

Descripción:	Congreso CIEN 2018
Curso académico	2018/19
Fechas:	19/09/2018 - 21/09/2018
Universidad o Entidad:	Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas
País:	España
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

Actividad: Redacción de documentos científicos (Neurociencia)

Descripción:	Aging (Albany NY)
Curso académico	2019/20
Fechas:	30/01/2019 - 30/01/2019
Universidad o Entidad:	Instituto Cajal, CSIC
País:	España
Mención Internacional:	No
Mención Industrial:	No
Estado:	Validada

LISTA DE PUBLICACIONES

- Munive, V., Zegarra-Valdivia, J.A., Herrero-Labrador, R., Fernandez, A.M., and Aleman, I.T. (2019). Loss of the interaction between estradiol and insulin-like growth factor I in brain endothelial cells associates to changes in mood homeostasis during peri-menopause in mice. *Aging (Albany, NY)*. 11, 174–184
- Serrano, M.P*, Herrero-Labrador, R*, Futch, H.S., Serrano, J., Romero, A., Fernandez, A.P., Samadi, A., Unzeta, M., Marco-Contelles, J., and Martínez-Murillo, R. (2017). The proof-of-concept of ASS234: Peripherally administered ASS234 enters the central nervous system and reduces pathology in a male mouse model of Alzheimer disease. *J. Psychiatry Neurosci*. 42, 59–69.
- Garzón, J., Herrero-Labrador, R., Rodríguez-Muñoz, M., Shah, R., Vicente-Sánchez, A., Wagner, C.R., and Sánchez-Blázquez, P. (2015). HINT1 protein: A new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology* 89, 412–423.
- Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Herrero-Labrador, R., Martínez-Murillo, R., Merlos, M., Vela, J.M., and Garzón, J. (2015). The σ 1 Receptor Engages the Redox-Regulated HINT1 Protein to Bring Opioid Analgesia Under NMDA Receptor Negative Control. *Antioxidants Redox Signal*. 22, 799–818.
- Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., Herrero-Labrador, R., Burgueño, J., Zamanillo, D., and Garzón, J. (2014). The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: Implications in antinociception and psychotic diseases. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 17, 1943–1955.
- Wang, L., Esteban, G., Ojima, M., Bautista-Aguilera, O.M., Inokuchi, T., Moraleda, I., Iriepa, I., Samadi, A., Youdim, M.B.H., Romero, A., et al. (2014). Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem*. 80, 543–561.
- Muneton-Gomez, V.C., Fernandez, A.P., Serrano, J., Velloso, L., Herrero-Labrador, R., Pozo-Rodríguez, A., Nieto-Sampedro, M., Taylor, J.S., Doncel-Perez, E., and Martínez-Murillo, R. (2012). Accepted Abstracts from the International Brain Injury Association's Ninth World Congress on Brain Injury. *Brain Inj*. 26, 309–799.